

**Daniel Filipe Mestre Simão**

**Novas Linhas Celulares Humanas para  
Produção de Adenovírus com Aplicação  
em Terapia Génica**

**LISBOA**

**2010**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Daniel Filipe Mestre Simão**

**Novas Linhas Celulares Humanas para Produção de  
Adenovírus com Aplicação em Terapia Génica**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadora:**

Doutora Paula Marques Alves (ITQB-UNL/IBET)

**Co-orientador:**

Doutor Pedro Cruz (ITQB-UNL/IBET)

**Elo de ligação:**

Profª. Doutora Ana Madalena Ludovice (FCT-UNL)

**LISBOA**

**2010**

## **Agradecimentos**

À Doutora Paula Alves pela oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Tecnologia de Células Animais, pela orientação, pelo exemplo de liderança e pelas excelentes condições de trabalho proporcionadas;

Ao Doutor Pedro Cruz pela orientação e pela disposição para ajudar na realização deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Madalena Ludovice pela disponibilidade e ajuda;

Ao corpo docente do Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa pelos conhecimentos transmitidos;

Ao Doutor Stefan Kochanek pelo fornecimento dos vectores adenovirais e das linhas celulares 1D9 e 1G3;

Ao Doutor Gernot Thomas John pelo fornecimento da unidade *Shake Flask Reader*;

À Carina Silva pela formação, conselhos, paciência e amizade. Por estar sempre presente e disponível para ajudar em todos os momentos;

Ao Marcos Sousa por toda a ajuda, boa disposição e pelos ensinamentos que ajudaram a enriquecer este trabalho;

A todas as pessoas do TCA, em especial ao “pessoal dos vírus” pelo excelente ambiente de trabalho, companheirismo e amizade;

A todos os colegas de mestrado pela amizade e por todos os momentos bem passados ao longo destes dois anos;

A todos os colegas de Biologia da FCUL, em especial à Andreia, à Cátia, à Mylène e ao Tiago pela amizade ao longo dos últimos 5 anos e pelas belas “cartadas” na esplanada do C5;

À minha família, em especial Pais, Irmão e Avós, pelo exemplo a seguir e apoio incondicional em todos os momentos e circunstâncias.

**A todos o meu muito obrigado!**

## Prefácio

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito da NoE CLINIGENE da União Europeia. O trabalho foi realizado no laboratório de Tecnologia de Células Animais do ITQB-UNL/IBET, onde existe larga experiência em processos de produção de vectores virais para terapia génica. O trabalho aqui descrito teve como base a avaliação de novas linhas celulares, derivadas de amniócitos humanos, para produção de vectores adenovirais recombinantes para terapia génica. Estas linhas celulares foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Stefan Kochanek da Universidade de Ulm, Alemanha.

Este trabalho contribuiu para três posters apresentados em três conferências internacionais, estando neste momento um artigo em preparação.

Silva, A. C., **Simão, D.**, Sousa, M. F. Q., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M. Adenoviral production performance of transformed human amniocyte cells. CLINIGENE annual meeting, Annecy, França (25 a 28 de Março de 2010).

Silva, A. C., **Simão, D.**, Sousa, M. F. Q., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M. Dissolved oxygen and pH profiles in shake flasks during 293 cell growth and infection with adenovirus. 13<sup>th</sup> ASGCT annual meeting – American Society of Gene & Cell Therapy, Washington, DC, E.U.A. (17 a 23 de Maio de 2010).

Silva, A. C., **Simão, D.**, Sousa, M. F. Q., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M. Dissolved oxygen and pH profiles in shake flasks during 293 cell growth and infection with adenovirus. 18<sup>th</sup> ESGCT annual meeting – European Society of Gene & Cell Therapy, Milão, Itália (22 a 25 de Outubro de 2010).

## Resumo

A terapia génica é uma área em grande desenvolvimento nos últimos anos. Prova disso é o número crescente de ensaios clínicos aprovados nesta área, sendo os vectores adenovirais recombinantes (rAdVs) os veículos de transferência génica mais utilizados. As células mais utilizadas para produção de rAdVs são as HEK293, no entanto, estas células podem comprometer seriamente a segurança do produto final, uma vez que pode ocorrer recombinação homóloga entre o genoma celular e o genoma viral, conduzindo à formação de rAdVs com capacidade replicativa (RCA).

Neste trabalho analisou-se o potencial de duas novas linhas celulares, derivadas de amniócitos humanos, 1D9 e 1G3 para a produção de rAdVs. Estas linhas celulares foram desenvolvidas de modo a não existirem sequências de homologia entre o genoma celular e viral, impossibilitando a formação de RCAs. A sua capacidade de produção de rAdVs foi avaliada comparativamente à da linha celular HEK293, em sistema estático e agitado, sendo realizada a caracterização metabólica das células durante o crescimento celular e infecção. Os valores de  $pO_2$  e pH do meio de cultura foram monitorizados, em sistema agitado, com precisão e não invasivamente, permitindo identificar parâmetros críticos a ter em conta no aumento de escala. O efeito da concentração celular no momento da infecção (CCI) na produção de rAdVs foi avaliado em culturas agitadas. A utilização das células 1G3 permitiu a infecção a CCIs superiores, sem uma diminuição significativa na produtividade específica, obtendo-se produtividades volumétricas superiores às das células HEK293. Este trabalho permitiu identificar e definir factores importantes para a produção rAdVs utilizando células 1G3, em sistema agitado.

Foram ainda realizados ensaios preliminares de transfecção transiente com sucesso nas células 1G3, o que poderá permitir a sua utilização para a manufacturação de outros bio-produtos para além dos rAdVs, aumentando a sua flexibilidade.

Os resultados obtidos aqui constituem informação valiosa para o futuro desenvolvimento e optimização de um processo de produção em bioreactor de bio-produtos para terapia em humanos, utilizando células potencialmente mais seguras.

## Abstract

The field of gene therapy is rapidly expanding over the last years, as indicated by the growing number of clinical trials approved in this field. Recombinant adenoviruses (rAdVs) have become the most used vectors for gene delivery in gene therapy applications. For almost two decades, HEK293 cells have been the only complementing cell line suitable for production of rAdVs. However the use of this cell line can seriously compromise the safety of the vectors produced, as a result of the possible generation of replication-competent adenovirus (RCA) caused by homologous recombination between vector and cellular DNA.

In this work it was evaluated the potential of two newly developed cell lines, derived from human amniocytes, 1D9 and 1G3 for production of rAdVs. These cell lines were designed to exclude the generation of RCAs, by designing the transforming plasmid to lack sequence overlap with current adenoviral vectors. Their ability for production of rAdVs were evaluated in comparison with HEK293 cells in static and stirred conditions. Metabolic characterization during cell growth and infection was performed. The  $pO_2$  content and pH of the medium were also monitored accurately and non-invasively in shake flasks, allowing to identify limitations for scale-up process. The effect of cell concentration at infection (CCI) on rAdV production was evaluated in stirred conditions. Using the 1G3 cells it was possible to infect the cells at higher CCI without a critical drop in specific productivity. Higher volumetric rAdV productivities were observed in these cells, in comparison with HEK293 cells. This work allowed the identification of important parameters regarding the production of rAdVs using the new 1G3 cells in stirred culture system.

Preliminary transient transfection studies were also performed with 1G3 cells, showing that would be possible to manufacture many other bioproducts.

These results constitute valuable information for the development and optimization of a large scale process for bioproducts in bioreactor using a potential safer human cell line.

## Índice

Agradecimentos .....	i
Prefácio .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice .....	v
1. Introdução .....	1
1.1. Tecnologia de células animais.....	1
1.1.1. Cultura de células animais .....	1
1.1.2. Metabolismo e necessidades nutricionais das células animais .....	3
1.1.2.1. Glucose e lactato .....	4
1.1.2.2. Glutamina e amónia .....	5
1.1.2.3. Parâmetros da cultura com influência no metabolismo celular .....	6
1.2. Terapia génica .....	8
1.2.1. Princípios e aplicações .....	8
1.2.2. Vectores para terapia génica .....	8
1.3. Os Adenovírus.....	10
1.3.1. A partícula viral .....	10
1.3.2. O genoma viral.....	11
1.3.3. Ciclo infeccioso .....	13
1.4. Vectores adenovirais para terapia génica .....	14
1.4.1. Linhas celulares complementares .....	15
1.4.2. Produção de vectores adenovirais.....	16
1.5. Produção de outros vectores virais para terapia génica.....	18
1.6. Objectivos do trabalho .....	19
2. Materiais e Métodos .....	21
2.1. Material biológico .....	21
2.1.1. Linhas celulares e meios de cultura .....	21
2.1.2. Vírus.....	21
2.1.3. Plasmídeo.....	21
2.2. Culturas celulares .....	22
2.2.1. Sistema estático.....	22
2.2.2. Sistema agitado .....	22
2.3. Estudos de crescimento celular e produção viral .....	22
2.3.1. Crescimento celular .....	22
2.3.2. Infecção viral .....	23
2.4. Ensaaios de transfecção .....	24



---

2.5.	Métodos analíticos.....	25
2.5.1.	Contagem de células .....	25
2.5.2.	Quantificação de nutrientes e metabolitos .....	25
2.5.3.	Titulação de partículas infecciosas .....	26
2.5.4.	Análise de apoptose, necrose e lise celular .....	26
2.5.5.	Análise da eficiência de transfecção .....	27
2.6.	Determinação dos parâmetros de crescimento, metabolismo e infecção viral.....	27
2.7.	Análise estatística.....	28
3.	Resultados e Discussão.....	30
3.1.	Sistema estático .....	30
3.1.1.	Caracterização do crescimento celular.....	30
3.1.2.	Produção de partículas infecciosas .....	31
3.1.3.	Caracterização do metabolismo celular .....	32
3.2.	Sistema Agitado .....	36
3.2.1.	Caracterização do crescimento celular.....	37
3.2.2.	Produção de partículas infecciosas .....	38
3.2.3.	Caracterização do metabolismo celular .....	39
3.2.4.	Monitorização de pH .....	43
3.2.5.	Monitorização de pO <sub>2</sub> .....	45
3.3.	Comparação entre sistema estático e agitado .....	48
3.4.	Influência da morte celular e internalização de rAdVs para a produção viral .....	49
3.4.1.	Análise de morte celular .....	49
3.4.2.	Cinética de infecção viral .....	52
3.5.	Ensaio de transfecção .....	54
3.6.	Conclusões e perspectivas futuras.....	56
4.	Bibliografia.....	58
Anexo I	.....	66

## 1. Introdução

### 1.1. Tecnologia de células animais

Actualmente para a produção de bio-fármacos, a indústria farmacêutica e de biotecnologia depende fortemente de processos baseados em cultura de células animais, principalmente de mamíferos. Entre os principais produtos obtidos através destes bio-processos estão os anticorpos, os interferões, as hormonas, os factores de coagulação, as vacinas e os vectores virais. A maioria destes bio-processos tem como base a cultura de linhas celulares estáveis, como as linhas CHO (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*), BHK (do inglês, *Baby Hamster Kidney*), HEK293 (do inglês, *Human Embryonic Kidney 293*) ou PER.C6™. Estas linhas celulares, apesar de apresentarem um crescimento celular muito mais lento e produtividades menores comparativamente com os microorganismos (como por exemplo *Escherichia coli*), possuem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas. Esta característica única das células eucarióticas faz com que a grande maioria dos bio-produtos com interesse terapêutico, devido à sua complexidade, apenas possam ser obtidos através destas células e não em microorganismos (revisto por Butler, 2005; Merten, 2006).

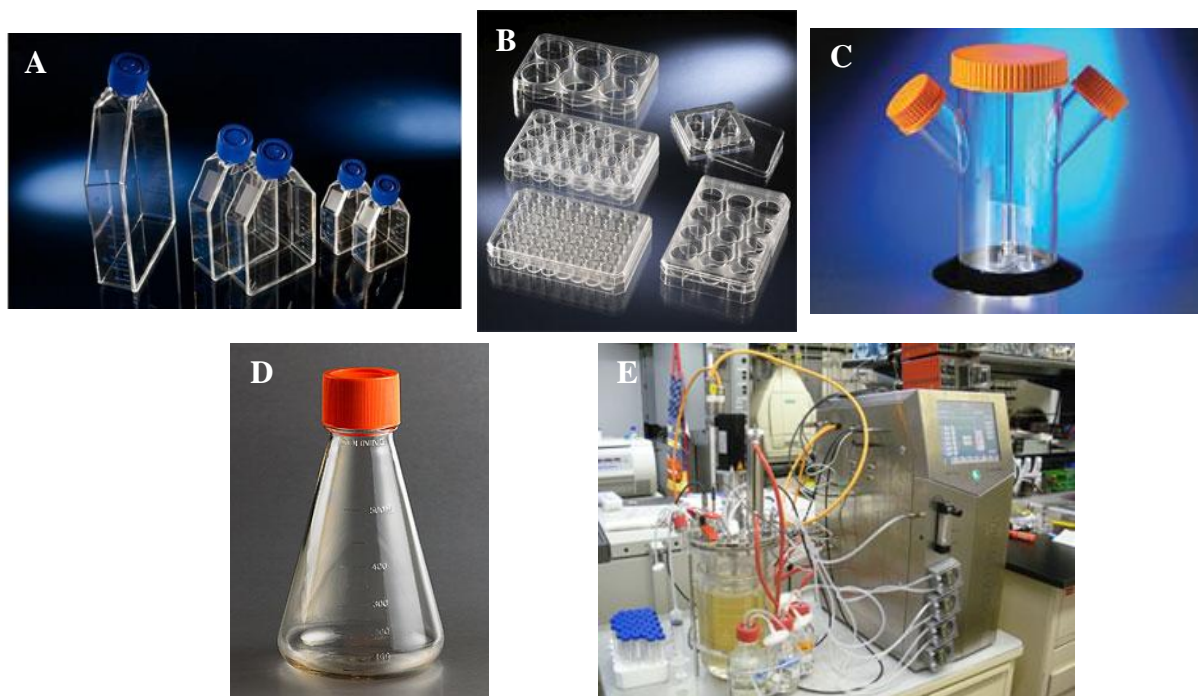
A tecnologia de células animais evoluiu a um ritmo impressionante nos últimos 15 anos, permitindo avanços significativos para a qualidade de vida das populações que usufruem das suas aplicações. Esta tecnologia tornou-se uma ferramenta com uma vasta gama de potenciais aplicações para o combate a várias patologias, permitindo o diagnóstico, a prevenção, a terapêutica e até mesmo a cura. Embora muitas das suas aplicações sejam relativamente recentes e ainda exijam muita pesquisa e conhecimento, é inquestionável o enorme potencial do uso desta tecnologia em áreas como a terapia celular, através da utilização de células estaminais, a engenharia de tecidos, permitindo a regeneração de tecidos danificados, ou a terapia génica, permitindo a terapêutica de inúmeras patologias (revisto por Alves *et al.*, 2008).

#### 1.1.1. Cultura de células animais

As células animais em cultura podem ser classificadas, de acordo com a sua origem, em culturas primárias e linhas celulares. As células primárias são isoladas directamente de órgãos ou tecidos, apresentando normalmente uma elevada heterogeneidade. Estas células têm uma capacidade finita de crescimento, sendo a sua subcultura limitada a poucas passagens. As células derivadas da subcultura e selecção de uma população de células de um único tipo são

designadas por linhas celulares. As linhas celulares podem ser finitas, sendo o número de subculturas limitado, ou contínuas. A obtenção de linhas celulares contínuas pode ser realizada: (i) pelo isolamento de células de tecidos tumorais, (ii) por imortalização mediante um processo de transfecção, ou (iii) podem surgir espontaneamente em cultura, ainda que muito raramente. A imortalização de células por transfecção pode ser conseguida pela utilização de químicos carcinogénicos ou pela introdução de genes virais ou oncogénicos. A cultura de linhas celulares contínuas apresenta várias vantagens, comparativamente com culturas de células primárias ou linhas finitas, destacando-se a sua maior rapidez de crescimento, assim como permitirem atingir concentrações celulares mais elevadas (revisto por Griffiths 2000).

Em cultura, as células animais podem ser propagadas em dois sistemas distintos, estático ou agitado. Para o sistema estático as células encontram-se aderentes a uma superfície sólida, utilizando-se por exemplo frascos ou placas de cultura (figura 1). No sistema agitado as células podem ser propagadas em suspensão no meio de cultura ou aderentes a pequenos suportes. Em ambos os casos, neste sistema, as culturas são continuamente agitadas, permanecendo as células, ou os suportes onde estão aderentes, em suspensão no meio de cultura. As culturas em sistema agitado podem ser realizadas, utilizando Erlenmeyers, frascos agitados (ou *spinner-flasks*) ou bioreactores.



**Figura 1** - Principais sistemas de cultura de células animais: (A) frascos de cultura; (B) placas de cultura; (C) frascos agitados; (D) Erlenmeyer; (E) bioreactor. (A e B retirados de [www.nuncbrand.com](http://www.nuncbrand.com); C de [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com); D de [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences))

Numa perspectiva de aumento de escala do processo, crítico para a produção de bio-fármacos, o sistema de cultura agitado é preferível. Este sistema apresenta várias vantagens relativamente ao sistema estático, entre as quais: (i) permite obter concentrações celulares significativamente superiores, (ii) é possível monitorizar o crescimento celular, pois é possível retirar amostras da cultura de forma não destrutiva, (iii) confere maior homogeneidade à cultura e (iv) é possível de forma eficaz controlar parâmetros importantes como pH e percentagem de oxigénio dissolvido ( $pO_2$ ), efectuando a cultura em bioreactor (revisto por Griffiths, 1986).

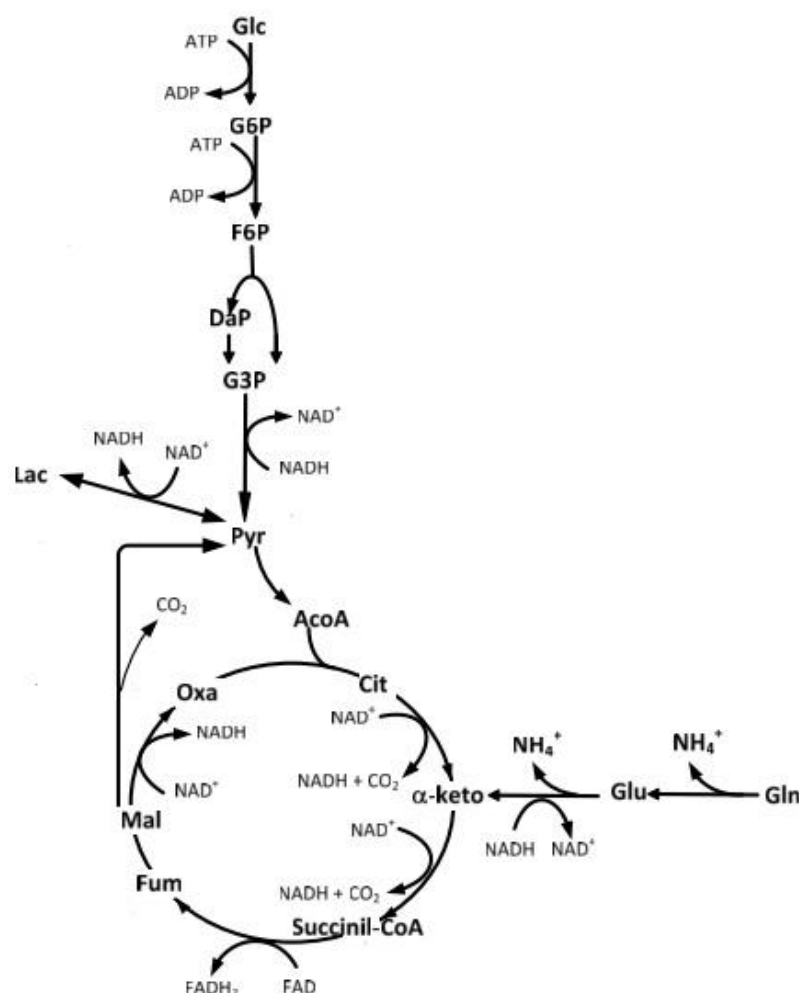
### **1.1.2. Metabolismo e necessidades nutricionais das células animais**

Para o crescimento e manutenção das culturas de células animais, é necessário garantir que as condições utilizadas sejam próximas das que se verificam *in vivo*. Assim é fundamental assegurar a manutenção de valores próximos dos fisiológicos para parâmetros como a temperatura, pH e concentrações de oxigénio ( $O_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e de nutrientes essenciais. Para tal, foram desenvolvidos meios de cultura de composição complexa que permitem garantir as necessidades nutricionais das células, mantendo a viabilidade e o crescimento celular durante longos períodos de tempo. Os meios de cultura apresentam geralmente na sua composição elementos como glícidos, sais, aminoácidos, vitaminas, lípidos, hormonas e factores de crescimento. Como principais fontes de carbono, usualmente, são utilizadas a glucose e a glutamina. Para a composição do meio de cultura, é ainda fundamental a presença de aminoácidos essenciais, visto as células serem incapazes de os sintetizar (revisto por Moraes *et al.*, 2008). De modo a integrar no meio de cultura a presença de elementos como hormonas ou factores de crescimento, é muitas vezes utilizado soro fetal bovino (FBS; do inglês, *Fetal Bovine Serum*) como suplemento ao meio de cultura. No entanto, a utilização de FBS é bastante desfavorável, devido à variação da sua composição entre lotes diferentes, resultando em diferenças nas culturas. Este factor pode levar a variações nos resultados obtidos, pela utilização de lotes diferentes, comprometendo a reprodutibilidade dos ensaios realizados. Em adição, o soro fetal é um potencial veículo de contaminantes e agentes patogénicos nomeadamente bactérias, fungos, vírus e príões (revisto por van der Valk *et al.*, 2010). Desta forma, actualmente, é encorajada a utilização de meios de cultura definidos e especialmente formulados para dispensar a adição de soro. Estes meios eliminam todas estas limitações, e por isso cada vez mais se exigem processos de produção em meio de cultura sem soro nem aditivos de origem animal. Existem, actualmente, várias formulações comercialmente disponíveis e optimizadas de acordo com a linha celular a cultivar.

Durante a cultura celular, a depleção de nutrientes, como a glucose ou a glutamina, ou a acumulação de produtos tóxicos provenientes do seu metabolismo, como o lactato ou a amónia, constituem as principais causas para a inibição do crescimento celular. De modo a manter as culturas celulares durante longos períodos de tempo, são efectuadas subculturas, utilizando meio de cultura fresco (revisto por Amable e Butler, 2008).

### 1.1.2.1. Glucose e lactato

A glucose é um dos nutrientes essenciais para as células de mamífero, pois constitui uma das principais fontes de carbono e de energia. As principais vias metabólicas de utilização da glucose levam à (i) produção de lactato, (ii) oxidação em  $\text{CO}_2$  no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), (iii) síntese de aminoácidos e (iv) produção de outros precursores de constituintes celulares (figura 2).



**Figura 2** - Esquema simplificado das principais vias metabólicas de consumo de glucose e de glutamina (adaptado de Sousa, 2009).

Ao contrário do que acontece nas células animais *in vivo*, as linhas celulares em cultura apresentam o metabolismo da glucose bastante desregulado. Isto sucede devido à elevada concentração de glucose nas condições de cultura clássicas, que favorece o seu consumo, já que o transporte para o citosol é feito por difusão facilitada. Desta forma nem todas as moléculas de glucose serão metabolizadas pelas vias oxidativas, conduzindo à consequente acumulação de piruvato no citosol. A incapacidade das células de metabolizarem todo o piruvato pelo ciclo TCA leva à formação de lactato, pela acção da enzima lactato desidrogenase. A acumulação de lactato provoca um decaimento do valor de pH da cultura, o que se poderá traduzir na inibição do crescimento celular. Ainda assim, os efeitos negativos da acumulação de lactato nas culturas não são normalmente observados para concentrações inferiores a 20mM, devido ao controlo do pH pelos tampões presentes no meio de cultura (revisto por Amable e Butler, 2008).

O metabolismo não oxidativo da glucose, pela produção de lactato, é significativamente menos eficiente do ponto de vista de produção de energia, produzindo apenas 2 moles de adenosina trifosfato (ATP) por mole de glucose, comparativamente com as 36 moles produzidas pelas vias oxidativas (ciclo TCA). A eficiência do metabolismo oxidativo da glucose pode ser avaliada pela determinação da razão molar entre a taxa específica de consumo de glucose ( $q_{Glc}$ ) e a taxa específica de produção de lactato ( $q_{Lac}$ ) ( $Y_{Lac/Glc}$ ). Quanto menor é o valor de  $Y_{Lac/Glc}$ , mais eficiente é o metabolismo da glucose. Um valor mais baixo de  $Y_{Lac/Glc}$ , denota que a maior parte do piruvato produzido é incorporado no ciclo TCA, portanto, menor será a produção de lactato e maior será a produção de energia (Cruz *et al.*, 1999; Maranga e Goochee, 2006).

#### 1.1.2.2. Glutamina e amónia

A glutamina é o aminoácido mais importante em cultura de células animais, tratando-se da principal fonte de azoto, podendo ainda ser utilizada como fonte de carbono e energia, em alternativa à glucose. Assim, a glutamina desempenha, não só um papel fundamental no metabolismo de azoto, permitindo a síntese de outros aminoácidos, mas também é importante como substrato para o ciclo TCA. Este aminoácido quando entra para o citosol é metabolizado em glutamato, com formação de amónia. O glutamato formado é seguidamente convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato, novamente com formação de amónia. Finalmente, o  $\alpha$ -cetoglutarato sintetizado será então incorporado directamente no ciclo TCA (revisto por Amable e Butler, 2008).

Tal como na glucose, também a glutamina é consumida com uma taxa superior às necessidades da célula, especialmente se o meio de cultura apresentar concentrações de glutamina superiores ao mínimo necessário. Isto leva à acumulação de amónia, assim como à diminuição da eficiência do metabolismo da glutamina. No entanto, a acumulação de amónia não se deve exclusivamente ao catabolismo da glutamina, já que o catabolismo de outros aminoácidos e a degradação espontânea da glutamina, também contribuem para a produção de amónia. Os efeitos tóxicos da amónia na cultura celular são observados a baixas concentrações, já que apenas cerca de 2-5 mM poderá levar à inibição do crescimento celular (Amable e Butler, 2008; Cruz *et al.*, 2000). O efeito tóxico da amónia, embora não esteja totalmente esclarecido, pode manifestar-se através da diminuição do pH intracelular, inibição da actividade de enzimas chave em diferentes vias metabólicas ou perturbação de gradientes iónicos celulares (Schneider *et al.*, 1996). De modo a diminuir a produção de amónia, as estratégias descritas compreendem a redução da concentração de glutamina para níveis mínimos em cultura que não afectem o crescimento celular (Ljunggren e Häggström, 1994) e a utilização de dipéptidos, como a alanil-glutamina e a glicil-glutamina, substituintes da molécula de glutamina (Christie e Butler, 1994).

A eficiência do metabolismo da glutamina, tal como para a glucose, também pode ser avaliada através da razão molar entre a taxa específica de consumo de glutamina ( $q_{\text{Gln}}$ ) e a taxa específica de produção de amónia ( $q_{\text{NH}_4^+}$ ) ( $Y_{\text{NH}_4^+/\text{Gln}}$ ). Quanto menor é a produção de amónia por mole de glutamina consumida, menor é a razão  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{Gln}}$ , logo, mais eficiente é o metabolismo deste aminoácido (Cruz *et al.*, 1999; Maranga e Goochee, 2006).

### 1.1.2.3. Parâmetros da cultura com influência no metabolismo celular

Nas culturas de células animais são vários os factores que podem ter uma grande influência no metabolismo celular. De entre os factores externos, os mais importantes são o pH, a temperatura e a concentração de  $\text{O}_2$  e de  $\text{CO}_2$ .

O valor de pH de uma cultura celular, idealmente, deverá variar entre os 7,0 e 7,4. Para algumas linhas celulares, observa-se a inibição do crescimento celular para valores inferiores a 6,8 (revisto por Griffiths, 2000). O valor de pH em cultura é mantido tamponizando o meio, de forma a compensar a produção de  $\text{CO}_2$  e de lactato provenientes do metabolismo celular, que contribuem para a acidificação do meio de cultura.

A temperatura pode ter uma grande influência no crescimento celular, assim como afectar a solubilidade de alguns componentes do meio, como o  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ . A grande maioria das

células de mamífero apresenta valores óptimos de temperatura entre os 35°C e os 37°C (revisto por Amable e Butler, 2008; Léo *et al.*, 2008).

O O<sub>2</sub>, a par do CO<sub>2</sub>, são os componentes da fase gasosa mais importantes nas culturas celulares. As moléculas de O<sub>2</sub> funcionam como aceitador final de electrões na cadeia respiratória mitocondrial, estando directamente ligados à produção de energia. A sua solubilidade nos meios de cultura é bastante baixa (cerca de 7 mg/L), tornando-se um dos factores limitantes numa cultura celular, especialmente para elevadas concentrações celulares (revisto por Gódia e Cairó, 2006). Em condições controladas, como em bioreactor, o oxigénio não é limitante uma vez que o valor de pO<sub>2</sub> pode ser controlado. O valor óptimo de pO<sub>2</sub> varia de acordo com a linha celular, situando-se de um modo geral entre 30-60% (revisto por Alves *et al.*, 2008; Gódia e Cairó, 2006). Este valor não deve ser muito baixo, já que condições de hipoxia podem inibir de forma acentuada o crescimento celular, nem muito alto, pois pode levar à formação de espécies reactivas de oxigénio livres que induzem a morte celular devido a danos oxidativos. Variações na concentração de O<sub>2</sub> disponível podem afectar as taxas específicas de crescimento celular e de consumo de glucose e glutamina (revisto por Amable e Butler, 2008).

O consumo de O<sub>2</sub> pelas células pode ser determinado pelo cálculo da taxa de consumo de oxigénio (OUR; do inglês, *Oxygen Uptake Rate*). O valor de OUR pode ser utilizado para calcular a taxa específica de consumo de oxigénio (qO<sub>2</sub>). A influência do oxigénio no metabolismo celular pode ser determinada pelo cálculo da razão molar entre as taxas específicas de consumo de oxigénio e glucose (Y<sub>O<sub>2</sub>/Glc</sub>) ou oxigénio e glutamina (Y<sub>O<sub>2</sub>/Gln</sub>). Quanto maior é o valor destas razões molares, mais eficiente a nível energético é o metabolismo celular, indicando que a maior parte da glucose ou glutamina consumida está a ser metabolizada no ciclo TCA (Cruz *et al.*, 1999; Maranga e Goochee, 2006).

O CO<sub>2</sub> é um produto do metabolismo celular, sendo produzido, por exemplo, pela oxidação da glucose. A sua importância está também relacionada com a sua utilização para regular o valor de pH de culturas celulares, através do equilíbrio com os iões bicarbonato. Geralmente os meios de cultura contêm uma determinada concentração de bicarbonato, que em equilíbrio com uma determinada percentagem de CO<sub>2</sub>, permite manter o pH em valores próximos dos fisiológicos. Este sistema de tampão é bastante utilizado, visto ser um método relativamente eficiente, de baixo custo e sem efeitos tóxicos para as células (revisto por Amable e Butler, 2008; Léo *et al.*, 2008).



## 1.2. Terapia génica

### 1.2.1. Princípios e aplicações

A terapia génica pode ser definida como a transferência e inserção de um gene funcional em células somáticas de um paciente, tendo como resultado um efeito terapêutico. Em comparação com a medicina tradicional, a terapia génica apresenta vantagens como a correcção de deficiências genéticas inatas ou mesmo possibilitar novas funções celulares. Desta forma, este tipo de terapia permite o tratamento de inúmeros distúrbios genéticos, tais como cancro, doenças infecciosas, distúrbios auto-imunes, entre muitos outros, utilizando para tal, genes como entidades terapêuticas (Räty et al. 2008; Bouard et al. 2009; Culver 1994).

A terapia génica pode ser realizada por dois métodos distintos, *ex vivo* ou *in vivo*. A abordagem *ex vivo* requer a remoção de células do paciente, que serão posteriormente sujeitas aos protocolos de transferência génica, ou transfecção. Seguidamente estas células são novamente implantadas no paciente. Este método possui a vantagem de permitir uma maior eficiência na transferência génica, assim como a possibilidade de aumentar a dose celular aplicada ao paciente, através da prévia propagação celular em cultura. Porém, tem a desvantagem de ser específica para cada paciente e, devido à manipulação das células e às dificuldades de manufacturação e de controlo de qualidade, é muito mais dispendioso. O método alternativo para terapia génica, *in vivo*, envolve a administração directa ao paciente do vector de transferência génica. Não sendo específica ao paciente, tem menos custos associados e menos requisitos logísticos e de infra-estruturas (revisto por Mountain, 2000).

Embora a definição e identificação, tanto do gene terapêutico apropriado, como do tecido alvo, seja muito importante para o sucesso da terapia génica, o passo limitante e actualmente o maior desafio, continua a ser a capacidade de transferência e inserção do gene de forma eficiente. Para tal é fundamental a utilização de veículos de transporte e entrega do gene terapêutico, ou transgene, às células alvo, vulgarmente designados por vectores.

### 1.2.2. Vectores para terapia génica

Os vectores para terapia génica podem dividir-se em dois grandes grupos, consoante as suas naturezas distintas: (i) vectores virais e (ii) vectores não virais. A capacidade natural dos vírus para transferência eficiente dos seus genes para o interior das células hospedeiras tornaram-nos numa ferramenta óbvia para o desenvolvimento de vectores para terapia génica. Actualmente, os vectores virais são aqueles que permitem maior eficácia na entrega de genes

de interesse a células alvo, existindo uma enorme variedade de vectores deste tipo disponíveis (consoante a família de vírus que lhes deram origem) (quadro 1). No entanto, existem também desvantagens associadas aos vectores virais: a limitação na dimensão do gene de interesse; a sua imunogenicidade; as dificuldades associadas à sua produção. Os vectores não virais (DNA livre, DNA condensado, lipossomas, lípidos catiónicos, entre outros) podem contornar algumas das dificuldades associadas à utilização dos vectores virais, mas a sua eficiência é bastante menor (revisto por Mountain, 2000; Robbins *et al.*, 1998; Walther e Stein, 2000).

**Quadro 1** - Resumo das principais vantagens e desvantagens dos vários vectores de terapia génica (adaptado de Mountain, 2000; Rätty *et al.*, 2008; Walther e Stein, 2000).

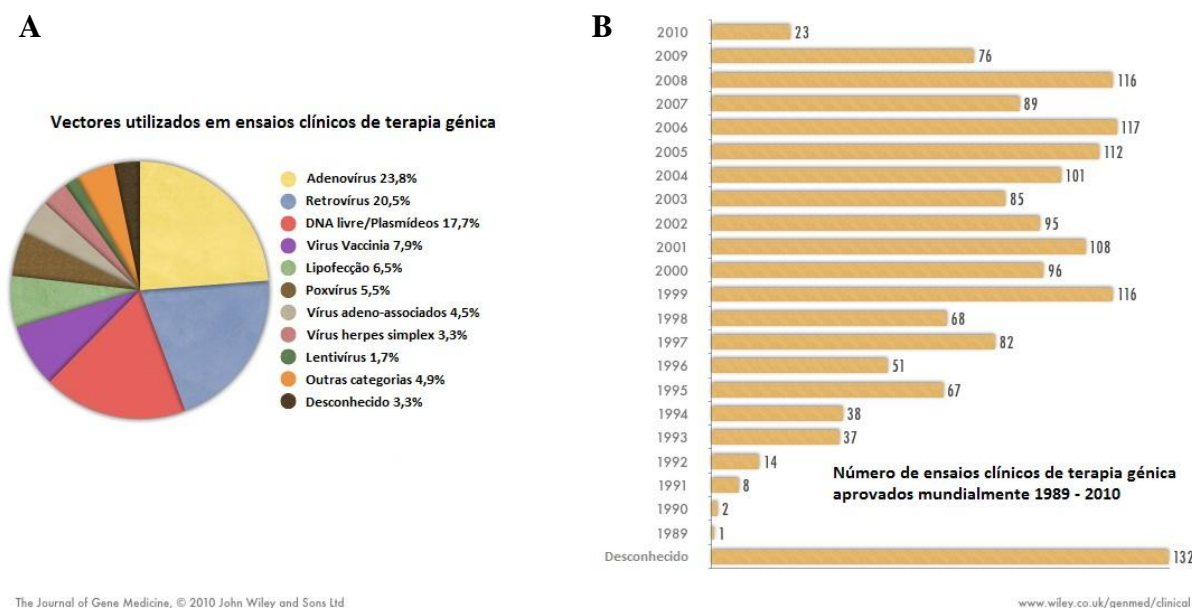
<i>Vector</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Adenovírus	Elevada eficiência de transferência génica Transfecção em células proliferativas e não proliferativas Produtividades elevadas	Elevada imunogenicidade Expressão génica transiente
Retrovírus	Expressão génica a longo prazo Baixa imunogenicidade	Transfecção apenas em células proliferativas Risco de mutagénese insercional Dificuldades na produção e armazenamento
Lentivírus	Transfecção em células proliferativas e não proliferativas Transfecção em células estaminais hematopoéticas	Risco de mutagénese insercional Risco de recombinação com vírus patogénico (HIV) Dificuldades na produção e armazenamento
Vírus adeno-associados	Baixa imunogenicidade Expressão génica estável Transfecção em células proliferativas e não proliferativas	Risco de mutagénese insercional Dificuldades na produção e armazenamento
Baculovírus	Capacidade para inserção de transgene de grandes dimensões Produtividades elevadas Não patogénicos	Transferência génica pouco eficiente Produção em células de insecto Genoma instável
Vectores não virais	Produção simples Não patogénicos	Transferência génica pouco eficiente Instabilidade

Para a escolha do vector a utilizar é importante analisar as especificidades das células alvo, assim como do transgene a utilizar. As diferentes características dos vectores levam a que sejam mais ou menos adequados, relativamente à aplicação pretendida.

O conceito e a tecnologia da terapia génica já existem há largos anos. As primeiras tentativas de utilizar vectores virais para entregar genes terapêuticos em pacientes humanos remontam ao início da década de 70, ainda que acabassem invariavelmente em fracasso. Apenas no início da década de 90 foi descrito o primeiro caso de sucesso de terapia génica,

onde foram utilizados vectores retrovirais na terapêutica de pacientes com melanoma (Rosenberg *et al.*, 1990).

O acumular de experiência e conhecimento, ao longo dos anos, foi conseguido com base em muitos casos de insucesso, resultantes do número crescente de ensaios clínicos de terapia génica aprovados (figura 3). Os ensaios clínicos têm abrangido uma grande diversidade de vectores utilizados, onde se destacam os vectores virais, derivados de adenovírus e retrovírus, e os não virais, utilizando DNA livre.



**Figura 3 - (A)** Vectores utilizados em terapia génica e **(B)** número de ensaios clínicos aprovados entre 1989 e 2010 (adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>).

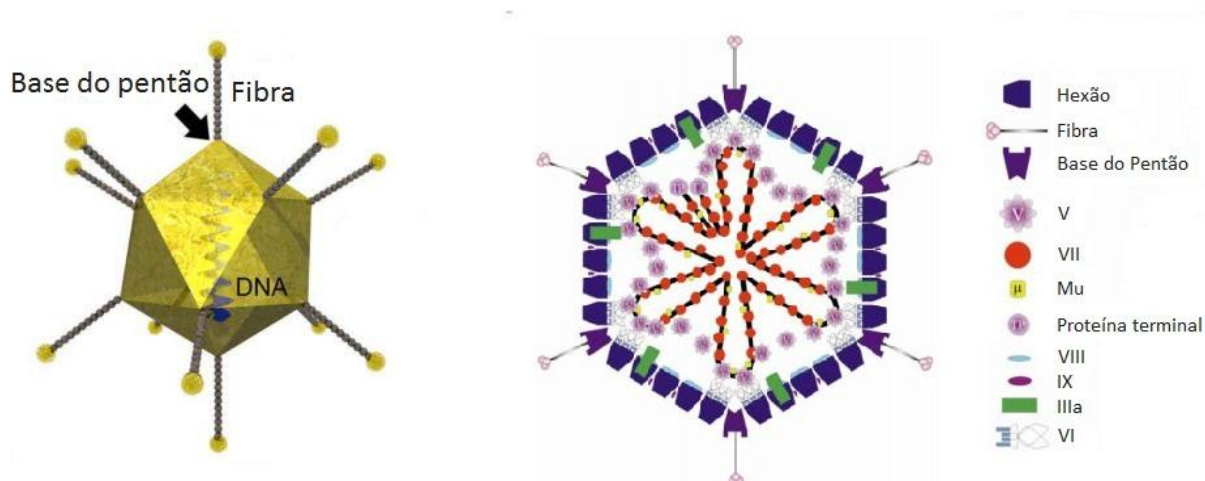
### 1.3. Os Adenovírus

Os adenovírus (AdVs), em humanos, surgem geralmente associados a infecções moderadas, sobretudo no trato respiratório superior, queratoconjuntivites e gastroenterites. Estes vírus pertencem à família *Adenoviridae*, género *Mastadenovirus*, estando actualmente divididos em 6 subgrupos (A-F), nos quais se inserem os cerca de 50 serótipos distintos descritos, classificados segundo as suas diferentes características imunogénicas. Os serótipos 2 (Ad2) e 5 (Ad5), membros do subgrupo C, são os mais utilizados para aplicações *in vivo*, já que não estão associados a patologias severas em humanos (revisto por Rätty *et al.*, 2008).

#### 1.3.1. A partícula viral

Os AdVs possuem uma morfologia bastante característica, com uma cápside icosaédrica, com um diâmetro entre 70 a 100 nm. Esta cápside é constituída por três proteínas principais, o

hexão, a base do pentão e a fibra (figura 4). A maior parte da cápside viral é coberta por 240 hexões, sendo que nos 12 vértices surgem as bases do pentão. De cada vértice, ou seja, de cada base do pentão projecta-se uma fibra que termina com uma estrutura globular, denominada domínio protuberante. Na cápside viral surgem ainda outras proteínas como a VI, VIII, IX, IIIa e IVa2 (revisto por Rätty *et al.*, 2008; Russell, 2000).



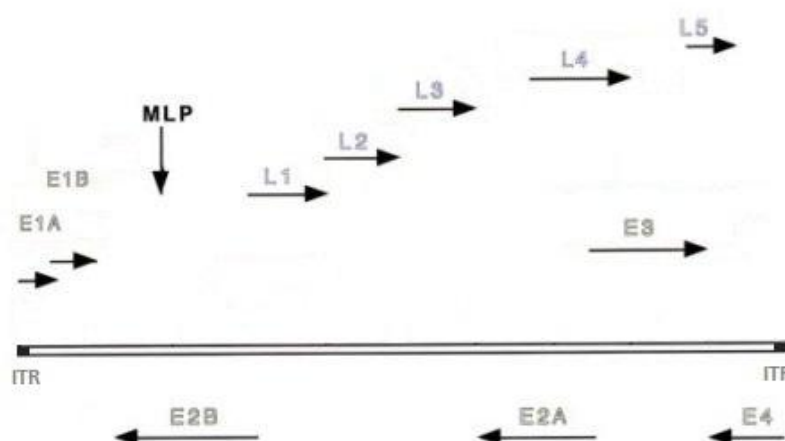
**Figura 4** - Representação esquemática de um AdV (adaptado de Rätty *et al.*, 2008; Russel, 2000)

### 1.3.2. O genoma viral

Os AdVs possuem um genoma linear de DNA em cadeia dupla, com aproximadamente 35 kb (figura 5). Cada extremidade da dupla cadeia de DNA viral é composta por repetições terminais invertidas (ITRs; do inglês, *Inverted Terminal Repeats*), cujas regiões 5' terminal estão ligadas covalentemente a uma proteína terminal. As ITRs assumem um papel importantíssimo na iniciação da replicação do DNA viral, providenciando locais de ligação a proteínas regulatórias virais e celulares, funcionando como origens de replicação (revisto por Robbins *et al.*, 1998; Walther e Stein, 2000).

Os genes adenovirais podem ser divididos em dois grandes grupos, consoante a cronologia da sua expressão, os genes de expressão precoce E (do inglês, *Early genes*) e os genes de expressão tardia L (do inglês, *Late genes*). O grupo de genes de expressão precoce, do qual fazem parte as regiões E1 (E1A e E1B), E2 (E2A e E2B), E3 e E4, são expressos antes do início da replicação viral. A primeira região a ser transcrita é a região E1, sendo a proteína E1A a primeira a ser expressa, funcionando como um importante regulador da expressão génica viral e também celular. A proteína E1A vai actuar na modulação do metabolismo celular, interferindo no processo de divisão celular e na expressão génica celular, favorecendo a transcrição do genoma viral. A proteína E1B actua em cooperação com

E1A, tendo como função principal impedir a activação de vias apoptóticas, garantindo e prolongando a viabilidade celular. Os polipéptidos codificados pela região E1 são ainda importantes na indução dos promotores das regiões E2, E3 e E4. A região E2 também é dividida em duas regiões, E2A e E2B. A região E2A codifica uma proteína de ligação ao DNA (DBP; do inglês, *DNA Binding Protein*), enquanto que a região E2B codifica uma polimerase de DNA e a proteína terminal. Estas proteínas fornecem não só a maquinaria necessária para a replicação do DNA viral, mas também são importantes para garantir a expressão dos genes tardios, através da interacção com vários factores celulares. Os produtos da expressão de E3, apesar de não participarem na replicação do genoma viral, são fundamentais na subversão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, interferindo, por exemplo, na resposta imunitária das células infectadas. A região E4 codifica proteínas que vão facilitar o transporte do mRNA viral, promover a replicação do DNA viral e inibir a síntese proteica celular (revisto por Russell, 2000).

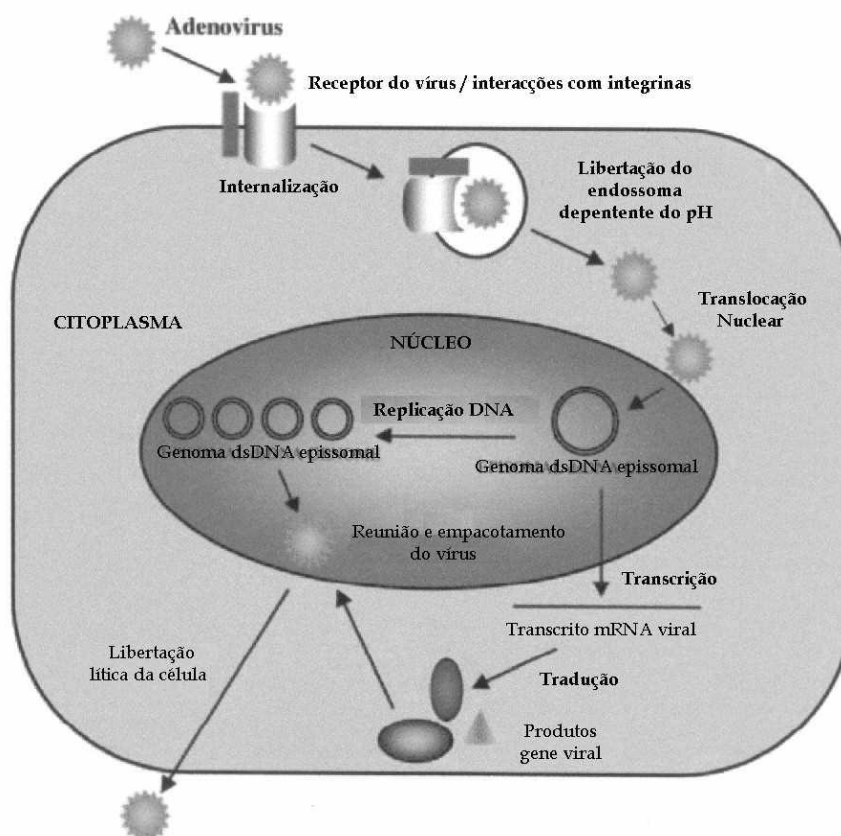


**Figura 5** - Representação esquemática do genoma de AdVs (adaptado de Russel, 2000)

Os genes de expressão tardia são apenas expressos após a replicação do DNA viral, estando agrupados em 5 regiões distintas, L1, L2, L3, L4 e L5. A expressão dos genes tardios leva à produção das várias proteínas estruturais da cápside viral, assim como favorece a encapsidação e maturação das partículas virais. Os genes tardios são expressos a partir do principal promotor tardio (MLP; do inglês, *Major Late Promotor*), levando à produção de, por exemplo, a base do pentão codificada pela região L2, o hexão codificado pela região L3 e a fibra proteica codificada pela região L5 (revisto por Imler, 1995; Russell, 2000).

### 1.3.3. Ciclo infeccioso

O ciclo infeccioso dos AdVs é um ciclo lítico, isto é, termina com a lise das células hospedeiras (figura 6). Este ciclo pode ser definido em três fases: (i) a entrada da partícula viral na célula hospedeira, (ii) o transporte do genoma viral para o núcleo celular, seguido da expressão génica selectiva, e (iii) a libertação lítica das partículas virais produzidas. A primeira fase pode demorar entre 6 a 8 horas, enquanto que a segunda fase é geralmente mais rápida, demorando entre 4 a 6 horas, seguindo-se a lise celular (revisto por Russell, 2000).



**Figura 6** - Representação esquemática do ciclo infeccioso dos AdVs (adaptado de Stone *et al.*, 2000)

A adsorção da partícula viral à célula alvo é feita pela interacção de alta afinidade entre o domínio protuberante da fibra proteica na cápside viral e um receptor celular denominado CAR (do inglês, *Coxsackie and Adenovirus Receptor*). A adsorção do vírus à célula através da ligação ao CAR, por si só, não é suficiente para activar as vias de internalização celular. Para que o vírus seja internalizado é crítico que, para além da ligação ao CAR, exista interacção entre a base do pentão e integrinas da superfície celular, do tipo  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ . Esta interacção promove a internalização da partícula viral por endocitose. Posteriormente, um subsequente decréscimo no pH no interior do endossoma, provoca alterações conformacionais nas proteínas da cápside viral e interfere na permeabilidade da membrana endossomal, o que

contribui para a saída do vírus para o citosol (revisto por Greber e Meier, 2003; Nemerow, 2000; Stone *et al.*, 2000). Já no citosol, a partícula viral é transportada até ao núcleo através de microtúbulos, por interacção com a proteína motora dineína. Junto à membrana nuclear a cápside viral, já algo degradada, é totalmente dissociada através da acção de algumas proteínas celulares, libertando o genoma viral. O DNA viral fica exposto junto à membrana nuclear, perto do complexo do poro nuclear (NPC; do inglês, *Nuclear Pore Complex*), o que permite a sua translocação para o nucleoplasma, embora este processo esteja pouco esclarecido (revisto por Mudhakar e Harashima, 2009). Após a entrada do genoma viral no núcleo da célula hospedeira inicia-se a expressão dos genes virais, levando à produção e maturação das partículas virais. Estas novas partículas virais serão depois libertadas para o meio extracelular através da lise das células hospedeiras.

#### 1.4. Vectores adenovirais para terapia génica

Actualmente os vectores virais derivados de adenovírus, ou vectores adenovirais recombinantes (rAdVs), são os mais utilizados em ensaios clínicos para terapia génica (Dormond *et al.*, 2009). A capacidade dos rAdVs de infectarem uma vasta gama de células e tecidos distintos, quer células com capacidade de divisão ou não, aliada à sua relativa facilidade de produção e purificação, faz com que estes vectores possuam um enorme potencial para a sua utilização como veículos de transferência de material genético (revisto por Rätty *et al.*, 2008; Walther e Stein, 2000).

A primeira geração de rAdVs é principalmente baseada nos serótipos Ad2 e Ad5. A construção destes rAdVs tem como base a deleção das regiões E1 e/ou E3, permitindo a introdução de DNA exógeno com dimensões até 6,5 kb, sob o controlo de um promotor heterólogo. A remoção da região E1 permite que os rAdVs não consigam completar o seu ciclo replicativo, já que deste modo a região E2, dependente da expressão de E1, não é transcrita. Assim sendo, estas partículas virais tornam-se veículos ideais para a transferência de material genético, uma vez que não conseguindo completar o seu ciclo replicativo, não comprometem a viabilidade das células alvo. No entanto, estes rAdVs apresentam várias desvantagens, já que a expressão do transgene é apenas transiente e é reprimida pela elevada resposta imunitária das células hospedeiras, devido à síntese de algumas proteínas virais.

Os rAdVs de segunda geração assentam na deleção adicional da região E2, relativamente aos rAdVs de primeira geração. No entanto, demonstram igualmente uma resposta imunitária significativa *in vivo*, limitando a duração e o nível da expressão do transgene.

O desenvolvimento de rAdVs significativamente menos imunogénicos, que os de primeira e segunda geração, baseia-se na deleção de todas as regiões E1, E2, E3 e E4, ou até mesmo todos ou quase todos os genes virais, aumentando a capacidade máxima para introdução de transgenes para cerca de 30 kb. Estes últimos são denominados de vectores “gutless”, possuindo apenas as sequências ITR e algumas sequências importantes no empacotamento. A ausência da maior parte do genoma viral nestes vectores, faz com que estes rAdVs estejam dependentes da presença de um vírus ajudante, para completarem o seu ciclo infeccioso durante a sua produção. No entanto, um dos principais problemas associados com a produção é a separação final dos vírus durante a purificação. Desta forma, apesar de alguns resultados promissores, as novas gerações de rAdVs necessitam ainda de aperfeiçoamentos de modo a poderem ser utilizados de forma eficiente e segura (revisto por Russell, 2000; Walther e Stein, 2000).

#### 1.4.1. Linhas celulares complementares

Para a produção de rAdVs, sendo que estes possuem parte do seu genoma deletado, é necessário recorrer a linhas celulares complementares. As linhas celulares complementares possuem sequências, provenientes de adenovírus, integradas no seu genoma, permitindo a complementação *em trans* das deleções do genoma dos vectores. A linha celular frequentemente mais utilizada para a produção de rAdVs é a linha HEK293. Esta linha celular foi desenvolvida na década de 1970, através da transfecção de células diplóides, provenientes de células de rim embrionário humano, com DNA de Ad5, complementando a região E1 deletada nos rAdVs (Graham *et al.*, 1977). No entanto estas células apresentam uma característica crítica para a aplicação terapêutica dos rAdVs produzidos. As células HEK293 possuem regiões de homologia entre o genoma viral integrado no genoma da célula e o genoma dos vectores normalmente utilizados. Estas regiões de homologia podem levar à ocorrência de fenómenos de recombinação homóloga, o que em última análise levará à produção de vectores adenovirais contendo a região E1, logo, com capacidade replicativa (RCAs; do inglês, *Replication-Competent Adenovirus*). Apesar da formação de RCAs, ser um evento relativamente raro, torna-se um aspecto bastante relevante em processos de produção de rAdVs em larga escala. A presença de RCAs num lote destinado a aplicação terapêutica constitui uma séria ameaça de segurança, já que poderá levar à replicação dos vectores nos pacientes. Este facto é particularmente grave no caso de pacientes imuno-comprometidos, que podem desenvolver complicações graves (Fallaux *et al.*, 1999).



Devido à séria limitação imposta pela presença de RCAs em lotes de rAdVs para aplicações terapêuticas, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas linhas celulares que permitam um nível de segurança maior. De modo a eliminar a possibilidade da formação de RCAs por recombinação homóloga, as estratégias para desenvolvimento de linhas celulares passam por garantir a ausência de sequências de homologia entre as células e os vectores. Seguindo esta direcção, foi desenvolvida a linha celular PER.C6™, integrando a região E1 do genoma de Ad5 em células derivadas de retina embrionária humana. Estas células são consideradas uma linha celular segura para a produção de rAdVs, visto não possuírem quaisquer regiões de homologia com os vectores (Fallaux et al. 1999). No entanto, a sua utilização está sujeita ao devido licenciamento, que comporta despesas impeditivas para as instituições académicas que garantem o desenvolvimento e o progresso do conhecimento científico da tecnologia de terapia génica.

Outro exemplo de linhas celulares desenvolvidas para a produção de rAdVs são as células derivadas de amniócitos humanos, que foram transfectadas com sucesso com a região E1 de Ad5. Os amniócitos humanos são relativamente fáceis de obter, já que estão presentes no líquido amniótico que pode ser recolhido por amniocentese. Estas células primárias recolhidas permitiram a sua transfecção com a região adenoviral E1 de forma relativamente eficiente, ao contrário de muitas células primárias derivadas de tecidos humanos que demonstram alguma resistência. A selecção dos clones, após a transfecção, permitiu o estabelecimento de uma nova linha celular (N52.E6), na qual foram registadas produtividades de rAdVs comparáveis às obtidas para as células HEK293. Esta linha celular, tal como as células PER.C6™, foi desenvolvida no sentido de não se obter qualquer região de homologia entre células e vectores utilizados, não permitindo a formação de RCAs. O facto de ser possível transfectar de forma eficiente estas células, abre as portas a inúmeras aplicações, para além da produção de AdVs, sendo potencialmente possível produzir outros vectores virais, como por exemplo lentivírus, ou proteínas recombinantes de interesse clínico (Schiedner *et al.*, 2000).

#### **1.4.2. Produção de vectores adenovirais**

A produção de vectores virais para aplicações terapêuticas em ensaios clínicos está sujeita a inúmeras directivas, de modo a garantir a segurança do produto final. Actualmente estes processos de produção têm obrigatoriamente que respeitar todas as directivas estabelecidas por agências responsáveis, como por exemplo, a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e a EMA (do inglês, *European Medicines Agency*) (Mandel *et al.*, 2008).

A produção de vectores virais, utilizando células animais, pode ser conseguida por três métodos distintos: (i) infecção viral, (ii) produção transiente e (iii) utilização de linhas celulares produtoras estáveis. A infecção viral, mais utilizada para a produção de vectores adenovirais, consiste na infecção de linhas celulares que permitem a replicação do vector utilizado. O método de produção transiente aplica-se geralmente à produção de vectores lentivirais. Neste método, as células são transfectadas com diferentes plasmídeos que permitem a expressão de todas as proteínas virais necessárias à produção das partículas virais. Finalmente, para a produção de, por exemplo, vectores retrovirais são utilizadas linhas celulares produtoras. Estas linhas celulares possuem os genes virais, essenciais para a formação das partículas virais, integrados estavelmente no genoma celular (revisto por Delenda *et al.*, 2007).

Actualmente, rAdVs são os veículos de transferência génica mais utilizados para terapia génica. O elevado potencial e a crescente procura destes vectores para aplicações em terapia génica ou para vacinação leva à necessidade de desenvolvimento de processos de produção robustos e eficientes. Estes processos devem garantir uma elevada produtividade e pureza dos vectores produzidos, mantendo os custos do processo baixos.

Os principais objectivos na optimização de um processo de produção de rAdVs, para aplicações terapêuticas, são: (i) a maximização da produtividade por volume de cultura, minimizando o volume total de meio utilizado, e (ii) obter uma suspensão viral uniforme e consistente para os processos de purificação.

A produtividade viral depende da construção dos rAdVs e da linha celular utilizada para propagar o vírus. Em conjunto com o vector e a linha celular, é necessária ainda a optimização da formulação do meio de cultura, da escala de produção e do sistema de cultura utilizado, de modo a maximizar a produção viral.

O processo de produção de rAdVs, inicia-se com uma fase de crescimento celular. Esta fase permite o crescimento celular da cultura até ao valor de concentração celular pretendido para a infecção (CCI; do inglês, *Cell Concentration at Infection*). A infecção da cultura é feita pela introdução de um determinado volume de stock viral, permitindo iniciar o ciclo infeccioso dos vectores. De modo a optimizar a produção viral, o processo de infecção deverá respeitar valores óptimos de parâmetros como a CCI ou a multiplicidade de infecção (MOI; do inglês, *Multiplicity Of Infection*). A optimização do valor de CCI é essencial para a maximização da produtividade. Actualmente a obtenção de produtividades específicas de rAdVs elevadas está limitada a baixas densidades celulares, por exemplo, cerca de  $1\text{-}2 \times 10^6$  célula/mL para as células HEK293 (Ferreira *et al.*, 2005a). Este fenómeno da quebra na

produtividade viral, para densidades celulares superiores, é denominado por “efeito da densidade celular”. Embora não estejam totalmente esclarecidos os factores que provocam este efeito, muitos autores consideram que a limitação nutricional ou a acumulação de produtos do metabolismo celular tóxicos, como o lactato ou amónia, podem ser em parte responsáveis (revisto por Garnier *et al.*, 1994; Nadeau e Kamen, 2003). A MOI, que corresponde ao número de partículas virais infecciosas por célula, deve também ser optimizado, de forma a garantir a sincronização da infecção de todas as células em cultura, ou seja, que todas as células sejam infectadas numa só vez e ao mesmo tempo. Esta infecção sincronizada permite que a libertação das partículas virais produzidas se dê sensivelmente ao mesmo tempo em todas as células, correspondendo ao momento ideal para a recolha da produção viral. O valor de MOI utilizado não deverá ser muito baixo (por exemplo, menor que 1), o que pode levar a que nem todas as células em cultura sejam infectadas, registando-se um ligeiro aumento na densidade celular, devido à multiplicação das células não infectadas. Por outro lado, o valor de MOI deve ser o mais baixo possível, minimizando o volume de stock viral necessário para o processo. O valor óptimo de MOI depende, em grande parte, das propriedades do stock viral, como por exemplo, a razão entre partículas totais e infecciosas e a estabilidade viral durante o armazenamento, manuseamento e processo de infecção (revisto por Altaras *et al.*, 2005).

### **1.5. Produção de outros vectores virais para terapia génica**

A tecnologia de células animais, permite a expressão de DNA exógeno, possibilitando a obtenção de muitos produtos com interesse farmacológico, como outros vectores virais (vectores lentivirais, por exemplo) ou até mesmo proteínas recombinantes, tais como, anticorpos monoclonais ou proteínas de fusão.

A expressão heteróloga em células animais pode ser obtida por dois sistemas diferentes, expressão estável ou transiente. A expressão estável é assegurada pela integração do DNA exógeno no genoma celular, permitindo obter uma expressão contínua da proteína de interesse. No entanto, este sistema é bastante moroso, devido ao necessário processo de selecção e isolamento de clones. Neste sistema a expressão do transgene é ainda influenciada significativamente pelo local do genoma onde foi integrado e pelo número de cópias integradas, podendo ser silenciado ou sobre-expresso devido à acção de sequências regulatórias vizinhas. A expressão transiente apenas permite a expressão do DNA exógeno durante um período de tempo limitado, devido à perda do gene pela célula, durante a sua divisão, ou por lise celular. Por outro lado, este sistema evita um significativo consumo de

tempo, já que não há necessidade de selecção de clones (revisto por Bollati-Fogolín e Comini, 2008).

A introdução de DNA exógeno em células animais pode ser realizada por infecção, utilizando vectores virais apropriados, ou por transfecção, mediada por métodos físicos ou químicos. O principal método físico de transfecção é a electroporação, onde se aplica um campo eléctrico às células que gera pequenos poros membranares por onde o DNA pode entrar para o interior da célula. No entanto este método requer instrumentos específicos, para além de optimização apurada da intensidade do campo eléctrico e da densidade celular utilizada, de modo a garantir a viabilidade celular após a transfecção. Os agentes químicos, como o fosfato de cálcio e os polímeros catiónicos, são preferencialmente utilizados devido à sua simplicidade e à sua eficiência de transfecção. A utilização do fosfato de cálcio é desvantajosa devido à variabilidade do método, em consequência das variações de pH e do difícil controlo dos precipitados formados. Os agentes catiónicos, como a polietilamina (PEI), são carregados positivamente, permitindo a sua ligação ao DNA que possui carga negativa, formando complexos PEI-DNA. Estes complexos entram para as células por endocitose e apresentam a capacidade de evitar a degradação lisossomal, entregando o DNA exógeno no núcleo da célula. Os agentes catiónicos são bastante mais utilizados em sistemas de expressão transiente devido à sua elevada eficiência de transfecção, menor toxicidade celular, relativamente ao fosfato de cálcio, estabilidade química e baixo custo de utilização. (revisto por Bernard, 2006; Bollati-Fogolín e Comini, 2008). De modo a conseguir-se uma eficiência de transfecção óptima, factores como a concentração de DNA utilizada, a razão PEI:DNA ou a concentração celular na altura da transfecção devem ser optimizadas (Ehrhardt *et al.*, 2006; Zaric *et al.*, 2004).

## **1.6. Objectivos do trabalho**

Este trabalho tem como principal objectivo avaliar a potencialidade de duas novas linhas celulares derivadas de amniócitos humanos, para serem utilizadas como alternativa às linhas celulares actualmente utilizadas na produção de rAdVs, nomeadamente as células HEK293. As novas linhas celulares possuem a região E1 de Ad5 integrada estavelmente no seu genoma, permitindo a propagação de rAdVs após a sua infecção. Estas células foram desenvolvidas de forma a não existirem regiões de homologia entre o genoma dos rAdVs e as sequências virais integradas no genoma celular, impossibilitando a formação de RCAs. Tendo estas células sido desenvolvidas recentemente, encontrando-se pouco estudadas, e sendo altamente promissoras

para aplicação em processos de produção de bio-fármacos, é essencial proceder à sua caracterização de modo a avaliar o seu potencial.

Numa primeira fase pretende-se seleccionar, de entre as duas novas linhas celulares, o clone que melhores resultados apresentar, relativamente ao comportamento celular (crescimento, metabolismo e produtividade viral). Para tal, serão realizados ensaios iniciais cultivando as células em sistema estático. O comportamento das novas linhas celulares será sempre analisado em relação ao observado para as células HEK293.

O clone seleccionado, após a primeira fase, será utilizado para novos estudos em sistema agitado, mantendo sempre as células HEK293 como referência. Para tal, as células, previamente adaptadas ao crescimento em suspensão, são cultivadas em Erlenmeyer. Nesta fase o trabalho realizado foca-se especificamente na:

- Caracterização do comportamento celular (crescimento, metabolismo e produção viral);
- Influência da infecção viral no crescimento e metabolismo celular;
- Influência da CCI no processo de produção viral;
- Identificação de possíveis limitações que permitam facilitar um futuro aumento de escala do processo para bioreactor;
- Influência da cinética de internalização de rAdVs para a produção viral;
- Influência da morte celular na produção viral.

Durante a realização dos ensaios em sistema agitado pretende-se ainda testar um sistema de monitorização de  $pO_2$  e pH em tempo real desenvolvido recentemente. Este sistema denominado por unidade *Shake Flask Reader* permite a monitorização em Erlenmeyer de forma simples e não invasiva.

Adicionalmente, pretende-se ainda avaliar a possibilidade da utilização da nova linha celular para processos de produção de outros bio-produtos, utilizando um sistema de expressão transiente. Para tal, foram realizados ensaios iniciais de transfecção de modo a analisar a capacidade de transfecção destas células.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material biológico

#### 2.1.1. Linhas celulares e meios de cultura

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhas celulares distintas. As células HEK293 (ATCC CRL-1573), HEK293T (gentilmente cedidas pelo Dr. Amos Panet, Hebrew University, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel), 1D9 e 1G3 (gentilmente cedidas pelo Dr. Stefan Kochanek, Ulm University, Alemanha) foram cultivadas em monocamada aderente, utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco). As células HEK293, HEK293T e 1G3, previamente adaptadas ao crescimento em suspensão, foram cultivadas em sistema agitado, utilizando meio Ex-Cell™ 293 (seguidamente referido apenas como Ex-Cell) (SAFC Biosciences, Hampshire, Reino Unido) suplementado com 4 mM de L-Glutamina (Gibco).

#### 2.1.2. Vírus

No presente trabalho foi utilizado um vector modelo, derivado da transformação de Ad5, no qual foi inserido o gene repórter que codifica a proteína GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*), gentilmente cedido pelo Dr. Stefan Kochanek (Ulm University, Alemanha). Para os ensaios de análise de morte celular foram utilizados rAdVs derivados de Ad5, sem o gene repórter da proteína GFP fornecidos pela Dra. Geneviève Libeau (CIRAD, France).

#### 2.1.3. Plasmídeo

Para os ensaios de transfecção realizados foi utilizado o plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ (InvivoGen, California, E.U.A.), que possui o gene repórter que codifica a proteína GFP.

## **2.2. Culturas celulares**

### **2.2.1. Sistema estático**

Em sistema estático, as linhas celulares foram cultivadas em incubadoras a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, utilizando frascos de cultura com superfícies de crescimento celular de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> e 175cm<sup>2</sup> (Starstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Germany). Para a subcultura celular o meio foi removido do frasco de cultura, a monocamada de células foi lavada com uma solução de PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) (Gibco) e as células incubadas a 37°C com tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) até perderem por completo a aderência à superfície de cultura. Encontrando-se a superfície de cultura sem células aderentes, foi adicionado meio de cultura e a suspensão celular obtida foi cuidadosamente ressuspensa e utilizada para inocular novos frascos de cultura. As células foram subcultivadas a cada 3-4 dias com uma taxa de diluição de 1:10.

### **2.2.2. Sistema agitado**

As culturas celulares em sistema agitado foram realizadas em Erlenmeyers, que foram mantidos em incubadoras a 37°C e 8% de CO<sub>2</sub> em ar, tendo sido utilizadas placas de agitação orbital a 130 rpm (IKA, Staufen, Alemanha). Foram utilizados Erlenmeyers com volumes totais de 125 e 500 mL (Schott, Mainz, Alemanha), utilizando 20 e 80 mL de volume útil, respectivamente. Para a realização da subcultura, a suspensão celular existente foi centrifugada a 300xg durante 10 minutos à temperatura ambiente (RT; do inglês, *Room Temperature*). O sedimentado obtido foi cuidadosamente ressuspensa em meio de cultura. A suspensão celular resultante foi utilizada para inocular novos Erlenmeyers com uma concentração celular de 0,5x10<sup>6</sup> célula/mL. A subcultura foi realizada a cada 3-4 dias, utilizando células em fase exponencial de crescimento.

## **2.3. Estudos de crescimento celular e produção viral**

### **2.3.1. Crescimento celular**

Neste trabalho foram realizados estudos de crescimento celular tanto para células não infectadas como para células infectadas. Para tal, em sistema estático, foram inoculados frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com uma concentração inicial de 0,6x10<sup>5</sup> célula/cm<sup>2</sup>, em número suficiente para permitir traçar a curva de crescimento. Para as culturas em sistema agitado, foram inoculados Erlenmeyers de 500 mL com uma concentração inicial de 0,5x10<sup>6</sup>

célula/mL. A concentração celular foi determinada diariamente em amostras de suspensões celulares das culturas. As suspensões celulares das culturas em sistema estático foram preparadas por incubação com tripsina-EDTA, tal como descrito em 2.2.1. No caso das culturas em sistema agitado, foram recolhidas amostras directamente da cultura.

Para posterior quantificação de nutrientes e metabolitos foram retiradas, diariamente, amostras dos sobrenadantes das culturas celulares. Estas amostras foram clarificadas para remoção de células e detritos celulares, sendo submetidas a um passo de centrifugação a 300x g, 10 min a RT.

No caso das culturas em sistema agitado, os valores de pO<sub>2</sub> e pH foram monitorizados, em tempo real, através de uma unidade *Shake Flask Reader* gentilmente cedida pelo Dr. Gernot Thomas John (PreSens GmbH, Regensburg, Alemanha). A recolha destes dados foi realizada através de sensores ópticos, não invasivos, colocados no fundo dos Erlenmeyers utilizados nesta unidade. A Luminescência destes sensores, detectada pela unidade *Shake Flask Reader*, depende da pressão parcial de O<sub>2</sub> e do pH. Os dados recolhidos foram depois convertidos e apresentados como valores de pO<sub>2</sub> e pH no software da unidade utilizada. Para este trabalho, foi definido um intervalo de tempo de 30 minutos para a aquisição de dados.

### 2.3.2. Infecção viral

Para a infecção das culturas celulares foi utilizado um stock de suspensões virais purificadas e de título infeccioso conhecido. Para todas as infecções foi utilizada uma MOI de 5. Em sistema estático, a infecção foi efectuada quando as culturas celulares atingiram uma confluência da superfície dos frascos de cultura na ordem dos 70-80%, com substituição completa do meio de cultura por outro com a suspensão viral. No caso das culturas em sistema agitado, a infecção foi efectuada para valores de CCI definidos, adicionando directamente o volume adequado de stock viral à cultura celular. Para analisar a influência da CCI na produção viral foram utilizadas CCIs de  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  célula/mL, para as células HEK293, e  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  célula/mL para as células 1G3. Para as cinéticas de internalização das partículas virais e para os ensaios de morte celular foram utilizadas CCI de  $1 \times 10^6$  célula/mL.

Após a infecção, foram recolhidas amostras, para posterior titulação de partículas infecciosas, em intervalos de tempo de acordo com o pretendido. Para análise da produção viral foram recolhidas amostras às 24, 36, 48 e 72 horas pós-infecção (hpi). Para a cinética de internalização das partículas infecciosas foram recolhidas várias amostras ao longo de 8 hpi. No caso das culturas em sistema estático, foram recolhidas amostras de sobrenadante, para



titulação de vírus extracelulares, e da suspensão celular, para titulação de vírus intracelulares. Nas culturas em sistema agitado, as amostras foram recolhidas directamente da cultura celular. Estas amostras foram submetidas a um primeiro passo de clarificação por centrifugação (1000xg, 10 minutos, RT), sendo o sobrenadante obtido recolhido para titulação de vírus extracelulares. De modo a proceder à recolha dos vírus intracelulares, procedeu-se à lise celular por ressuspensão do sedimento de células (obtido por centrifugação) em solução de Triton X-100 a 0,1% (v/v) em Tris-HCl (Calbiochem, Califórnia, E.U.A.) 10mM, pH 8. Por fim, esta suspensão foi clarificada por centrifugação (3000xg, 10 min, RT), sendo recolhido o sobrenadante. Todas as amostras recolhidas foram alíquotadas e armazenadas a -85°C.

## 2.4. Ensaios de transfecção

Para este trabalho, os ensaios de transfecção foram realizados para as células 1G3 e HEK293 adaptadas a crescimento em sistema estático e em sistema agitado. Estes ensaios foram realizados em escalas pequenas, utilizando placas de cultura de 6 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca). A transfecção foi realizada utilizando um método químico, por acção do agente catiónico PEI linear, com 25 kDa de peso molecular a 1 mg/mL (Polysciences, Philadelphia, E.U.A.). Foi usada uma razão PEI:DNA de 3:1, sendo a concentração de plasmídeo utilizada de 2,5 µg DNA/mL.

A preparação das formulações de transfecção foi efectuada adicionando o volume necessário de DNA ao meio de cultura, sendo depois adicionado lentamente o volume apropriado de PEI. Após mistura dos três componentes, a solução de transfecção foi agitada vigorosamente e incubada durante 10 min a RT antes de ser adicionada à cultura.

Inicialmente foi analisada a influência do meio de cultura na transfecção, utilizando células adaptadas a sistema estático. Para tal, utilizando meio Ex-Cell e Freestyle™ 293 Expression Medium (seguidamente referido apenas como Freestyle) (Gibco), foram testadas várias formulações de transfecção diferentes: 100% Ex-Cell; 100% Freestyle; Ex-Cell + 1% FBS; Freestyle + 1% FBS; 75% Ex-Cell + 25% Freestyle; 50% Ex-Cell + 50% Freestyle; 25% Ex-Cell + 75% Freestyle; 12,5% Ex-Cell + 87,5% Freestyle. As placas de cultura foram inoculadas com uma concentração inicial de  $0,5 \times 10^6$  célula/mL, utilizando DMEM com 10% de FBS. Quando as culturas atingiram um valor de densidade celular próximo de  $1 \times 10^6$  célula/mL foram então transfectadas utilizando as condições anteriormente descritas. Para tal, o sobrenadante de cada cultura foi retirado, sendo seguidamente adicionado o volume apropriado da formulação de transfecção.

Para os estudos de transfecção em células adaptadas a crescimento em sistema agitado, foram utilizadas apenas as formulações de transfecção 100% Freestyle e Freestyle + 1% FBS, preparadas como descrito anteriormente. As placas de cultura foram inoculadas com uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  célula/mL. Aproximadamente 4 horas após a inoculação das placas, o sobrenadante das culturas foi desprezado, adicionando-se seguidamente o volume apropriado de formulação de transfecção.

A análise da expressão de GFP foi realizada às 24, 48 e 72 horas pós-transfecção. Para a análise da expressão de GFP, as culturas celulares foram recolhidas dos poços respectivos, sendo preparadas suspensões celulares tal como descrito em 2.2.1.

## **2.5. Métodos analíticos**

### **2.5.1. Contagem de células**

A determinação da concentração e viabilidade celular foi realizada por contagem directa ao microscópio óptico com objectivas de contraste de fase utilizando o método de exclusão do azul de triptano. Uma alíquota da suspensão celular, após coloração em azul triptano (Gibco) a 0,1% (v/v) em PBS e numa diluição apropriada à contagem, foi colocada nas duas câmaras de contagem de um hemacitómetro Fuchs-Rosenthal (Brand, Wertheim, Alemanha) procedendo-se então à contagem. Neste método é possível distinguir as células viáveis (brilhantes e transparentes) das células não viáveis que, sendo permeáveis ao corante, ficam azuis.

### **2.5.2. Quantificação de nutrientes e metabolitos**

A determinação de glucose, lactato e glutamina foi feita pelo equipamento YSI modelo 7100 (YSI Life Sciences, Ohio, EUA).

A quantificação dos aminoácidos foi realizada recorrendo ao método *AccQ.Tag Amino Acid Analysis* (Waters, Massachusetts, E.U.A.). Este método baseia-se na pré-derivatização dos aminoácidos, utilizando o reagente AccQFluor (Waters), seguida da separação dos derivatizados por cromatografia de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) e respectiva quantificação por fluorescência.

A determinação da concentração de amónia foi efectuada através da utilização do método K-AMIAR (Megazyme, Ireland), sendo depois a quantificação efectuada pela leitura das amostras no espectrofotómetro DU®530 (Beckman, California, E.U.A.).

### 2.5.3. Titulação de partículas infecciosas

A determinação da concentração de partículas infecciosas foi realizada por infecção de células HEK293. As células ficam fluorescentes quando infectadas devido à expressão da GFP. Uma concentração definida de células aderentes foi infectada pelos vírus em questão, com diluições sucessivas (de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e em duplicado. Às 24 horas pós-infecção (hpi) as células foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS com 5% (v/v) de FBS. A percentagem de células fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo (CyFlow Space, Partec, Alemanha), onde o sinal fluorescente verde da GFP foi detectado por um tubo fotomultiplicador depois de passar por um filtro de banda (FL1) de 525 nm. As diluições consideradas para cálculo do título foram aquelas que apresentaram menos de 30% de células fluorescentes, percentagem até onde é garantido que um vírus infecta apenas uma célula. O título de partículas infecciosas (p.i.) foi calculado tendo em conta a percentagem de células infectadas, o número total de células que foi submetido à infecção viral, a diluição e o volume de vírus utilizado para infectar as células (Gueret *et al.*, 2002).

$$\text{Título infeccioso (p.i./mL)} = \frac{\% \text{ células GFP-positivas}}{\text{Volume de suspensão viral}} \times \text{Diluição viral} \times \text{CCI}$$

### 2.5.4. Análise de apoptose, necrose e lise celular

Para a avaliação do estado de viabilidade e morte celular foram utilizados dois marcadores fluorescentes, o iodeto de propídio (PI) (Molecular Probes, Paisley, Reino Unido) (1mg/mL) e o iodeto de 3,3'-dihexiloxocarbocianina (DiOC<sub>6</sub>) (Molecular Probes) (20  $\mu$ M). Para estes ensaios foram utilizados rAdVs sem o gene que codifica a proteína GFP, de modo a eliminar a interferência no sinal verde fluorescente da marcação celular por DiOC<sub>6</sub>.

Os marcadores PI e DiOC<sub>6</sub> foram adicionados a 1 mL de uma suspensão celular com cerca de  $1 \times 10^6$  células/mL, numa razão de 1:1000. Após a adição dos marcadores, as amostras foram incubadas durante 20 minutos a 37°C. Estas amostras foram preparadas diariamente, em triplicados. As amostras preparadas foram imediatamente analisadas no citómetro de fluxo onde os sinais fluorescentes foram detectados por um tubo fotomultiplicador, depois de passar por um filtro de banda (FL1) de 525 nm, para o sinal do DiOC<sub>6</sub>, e um filtro de banda (FL3) de 650 nm, para o sinal do PI. A percentagem de células nos diferentes estados foi obtida directamente do citómetro de fluxo, após a análise das amostras.

### 2.5.5. Análise da eficiência de transfecção

As amostras preparadas, descritas em 2.4, foram imediatamente analisadas no citómetro de fluxo, onde foi determinada a percentagem de células a expressarem GFP. A viabilidade celular foi determinada por marcação com PI, tal como descrito em 2.5.4. A determinação da eficiência da transfecção foi efectuada considerando apenas a população de células viáveis, sendo o seu valor correspondente à percentagem de células que expressam GFP dentro desta população.

### 2.6. Determinação dos parâmetros de crescimento, metabolismo e infecção viral

A taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ ) foi determinada através da regressão semi-logarítmica dos valores das concentrações de células viáveis em função do tempo (t), utilizando a equação:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln\left(\frac{X_v}{X_{v0}}\right)}{t}$$

onde,  $X_{v0}$  e  $X_v$  são, respectivamente, as concentrações de células viáveis no tempo inicial e no tempo t. O tempo de duplicação celular ( $t_d$ ) foi determinado por:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

As taxas específicas de consumo de nutrientes ou de produção de metabolitos ( $q_s$ ) foram determinadas por:

$$q_s = \frac{1}{X_v} \times \frac{\Delta S}{\Delta t}$$

onde,  $\Delta S$  é a variação da concentração de nutriente ou metabolito no intervalo de tempo  $\Delta t$ .

Assumindo que a taxa OUR é idêntica à taxa de transferência de oxigénio OTR (do inglês, *Oxygen Transfer Rate*), o valor de OUR foi determinado por:

$$OUR = OTR = K_{La} \times (C^* - C)$$

onde,  $K_{La}$  é o coeficiente de transferência de massa (ver anexo I),  $C^*$  a concentração de oxigénio na saturação e  $C$  a concentração de oxigénio em solução.

O consumo específico de oxigénio ( $q_{O_2}$ ) foi determinado pela equação:

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{X_v}$$

As razões molares entre as taxas específicas de consumo/produção de nutrientes, metabolitos ou oxigénio ( $Y_{x/y}$ ) foram determinados por:

$$Y_{x/y} = \frac{q_x}{q_y}$$

As produtividades volumétricas e específicas de rAdVs foram determinadas por:

Produtividade volumétrica = título infeccioso extracelular + título infeccioso intracelular

$$\text{Produtividade específica} = \frac{\text{Produtividade volumétrica}}{\text{CCI}}$$

## 2.7. Análise estatística

O erro associado a cada medição foi determinado ou pelo desvio padrão de diferentes leituras independentes ou assumindo o valor do erro da leitura para cada medição anunciado pelo fabricante dos equipamentos utilizados. Para os parâmetros determinados, foi calculado o erro propagado. Para uma soma ou uma subtração, o erro propagado foi determinado por:

$$\Delta A = \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2 + \dots + (\Delta n)^2}$$

onde,  $\Delta A$  é o erro associado ao parâmetro  $A$  e  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  e  $\Delta n$  são os erros associados à medição das variáveis  $x$ ,  $y$  e  $n$ , respectivamente. Para o caso de uma multiplicação ou de uma divisão, o erro propagado foi determinado por:

$$\Delta A = \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\Delta n}{n}\right)^2} \times A$$

A análise estatística foi realizada através do método de análise de variância ANOVA, para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados e Discussão

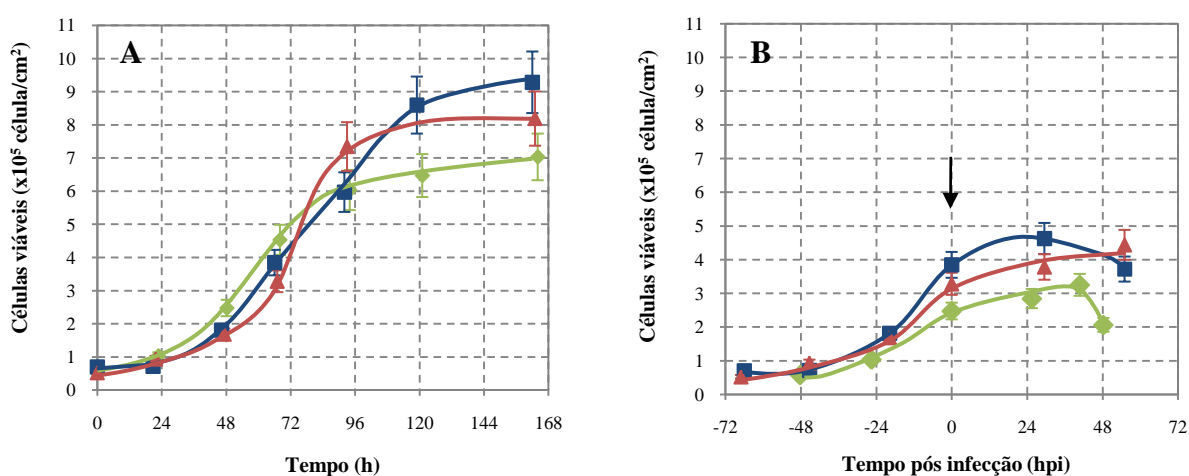
#### 3.1. Sistema estático

O presente trabalho teve como objectivo avaliar a potencialidade de novas linhas celulares para a produção de rAdVs para terapia génica, em alternativa às linhas celulares tradicionalmente utilizadas, como as células HEK293. Para tal, numa primeira fase, caracterizaram-se as novas linhas celulares 1D9 e 1G3, em termos de crescimento celular e metabolismo, para sistema estático, em comparação com as células HEK293.

A capacidade das células para produção de rAdVs foi avaliada pela infecção com uma MOI de 5, escolhida de acordo com o descrito anteriormente por Ferreira et al. (2005b).

##### 3.1.1. Caracterização do crescimento celular

Os ensaios realizados permitiram obter um perfil de crescimento celular (figura 7), assim como determinar os parâmetros  $\mu_{\max}$  e  $t_d$  (quadro 2), para as células 1D9, 1G3 e HEK293.



**Figura 7** – Perfis de crescimento das células (A) não infectadas e (B) infectadas. 1D9 (■), 1G3 (▲) e HEK293 (◆). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais. A seta em B indica o momento da infecção.

**Quadro 2** – Caracterização do crescimento celular para as diferentes linhas celulares.

Linha celular	$X_{v_{\max}}$ (x10 <sup>5</sup> célula/cm <sup>2</sup> )		$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)
	Cél. não infectadas	Cél. infectadas		
1D9	9,3 ± 0,9	4,6 ± 0,5	0,032 ± 0,003	21,6 ± 2,2
1G3	8,2 ± 0,8	4,4 ± 0,4	0,029 ± 0,001	23,8 ± 0,5
HEK293	7,0 ± 0,7	3,3 ± 0,3	0,030 ± 0,001	23,0 ± 0,4

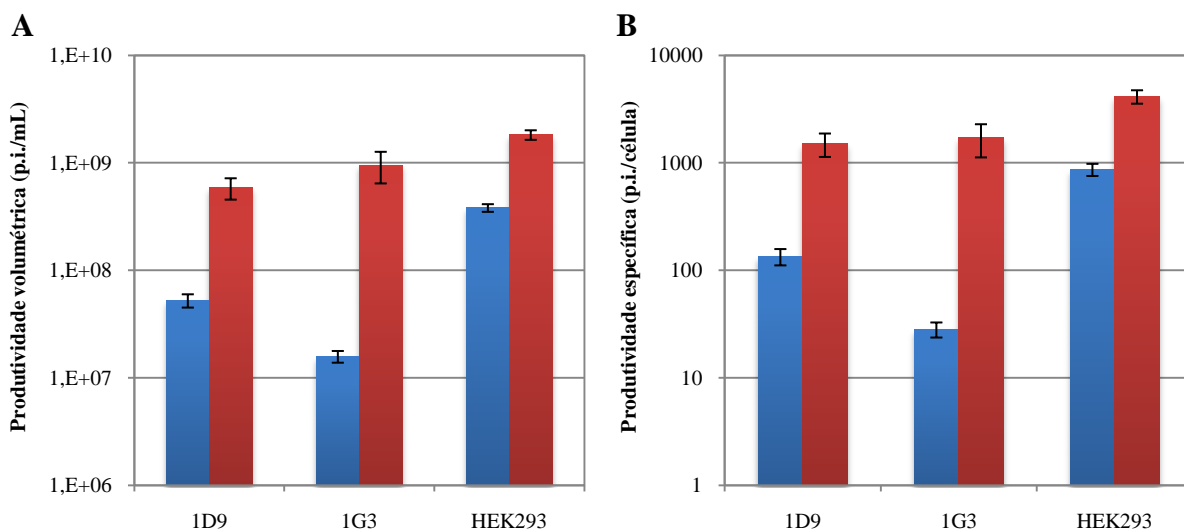
$X_{v_{\max}}$  – concentração máxima de células viáveis;  $\mu_{\max}$  – taxa específica de crescimento;  $t_d$  – tempo de duplicação.

O crescimento celular foi superior para as células 1D9 e 1G3, comparativamente com as células HEK293, atingindo valores de  $X_{v_{max}}$  de aproximadamente  $9,3$ ,  $8,2$  e  $7,0 \times 10^5$  célula/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Quanto à velocidade específica de crescimento celular, não se observaram diferenças significativas nos valores de  $\mu_{max}$  e  $t_d$ . Os valores obtidos para as células HEK293, de  $X_{v_{max}}$  ( $7,0 \pm 0,7 \times 10^5$  célula/cm<sup>2</sup>) e  $\mu_{max}$  ( $0,030 \pm 0,001$  h<sup>-1</sup>) estão de acordo com o que está descrito na literatura para estas células (Park *et al.*, 2004).

Quanto às células infectadas, foi possível observar um decréscimo dos valores de  $X_{v_{max}}$  para aproximadamente metade dos valores registados nas células não infectadas, para todas as linhas celulares. Este resultado pode ser justificado pelo facto da infecção das células pelos rAdVs induzir a paragem do crescimento celular, já que após a infecção, a maquinaria celular é direccionada para a replicação viral (revisto por Russell, 2000).

### 3.1.2. Produção de partículas infecciosas

As produtividades, volumétrica e específica, obtidas nestes ensaios, encontram-se representadas na figura 8.



**Figura 8.** Produtividade (A) volumétrica e (B) específica de partículas infecciosas às 24 (■) e 48 hpi (■), nas três linhas celulares.

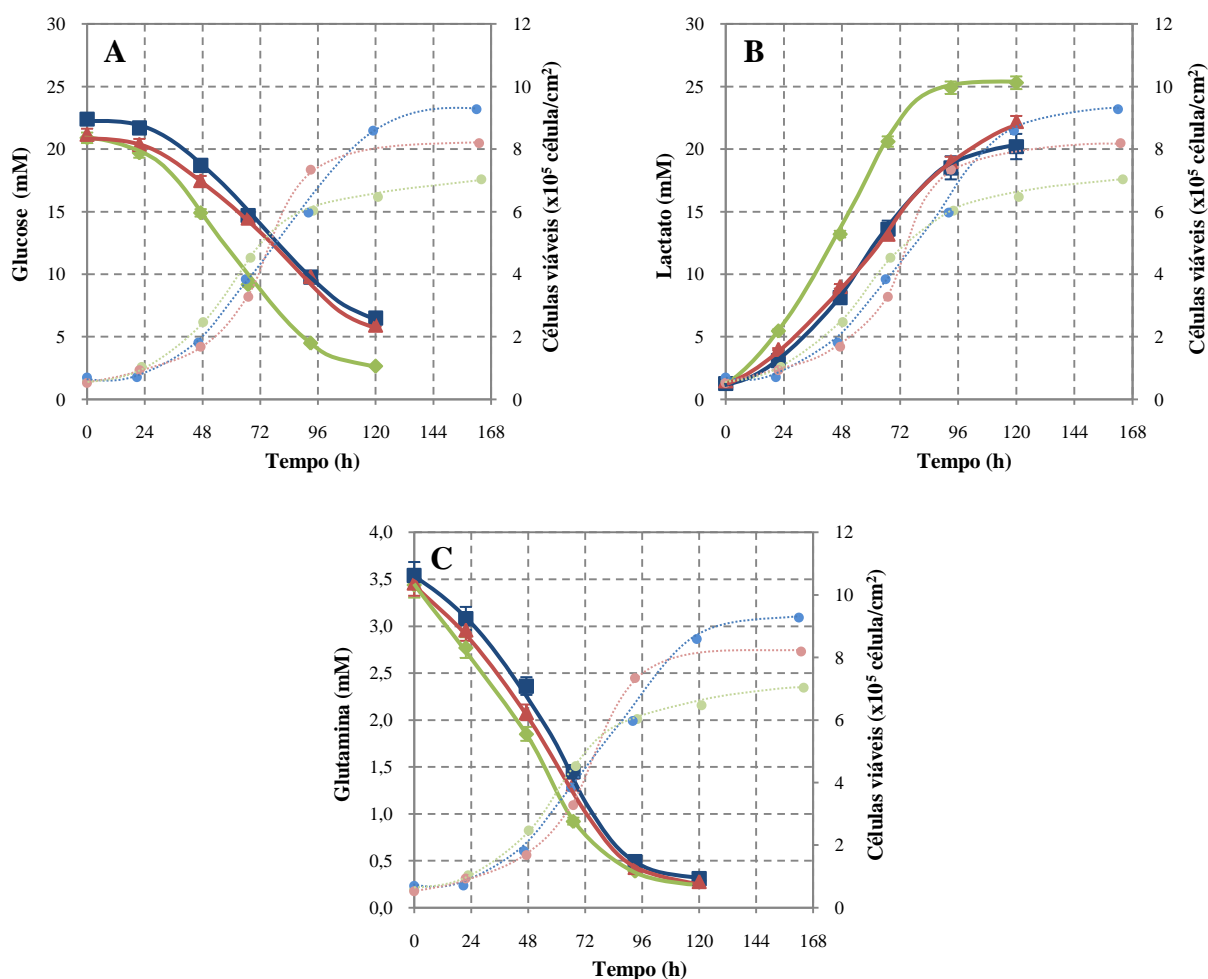
Analisando os resultados, observou-se que a produtividade máxima, para ambas as linhas celulares, foi obtida às 48 hpi, tal como descrito anteriormente (Ferreira *et al.*, 2005b). Quanto às produtividades volumétricas (figura 8.A), as células 1D9 e 1G3 foram significativamente menos eficientes ( $0,6 \pm 0,1$  e  $1,0 \pm 0,3 \times 10^9$  p.i./mL, respectivamente), comparativamente com as células HEK293 ( $1,8 \pm 0,2 \times 10^9$  p.i./mL). As células 1D9 e 1G3 apresentaram, às 48 hpi,



produtividades específicas (figura 8.B) de  $1499 \pm 368$  e  $1699 \pm 580$  p.i./célula, respectivamente, enquanto que as células HEK293 apresentaram uma eficiência significativamente superior, produzindo  $4127 \pm 589$  p.i./célula. Os resultados obtidos para a produção de rAdVs, neste trabalho, foram inferiores ao descrito anteriormente para as células HEK293, em sistema estático (Wu *et al.*, 2002). No entanto, as diferentes condições utilizadas neste trabalho, tais como o meio de cultura, os vectores utilizados e os métodos para titulação de partículas infecciosas, podem justificar as diferenças registadas.

### 3.1.3. Caracterização do metabolismo celular

De modo a perceber as diferentes produtividades obtidas, foi realizada a caracterização metabólica das células. Os perfis de consumo/produção de metabolitos, para as diferentes linhas celulares encontram-se representados na figura 9. Estes perfis permitiram determinar as taxas específicas de consumo/produção e as suas razões molares (quadro 3).



**Figura 9.** Perfis de consumo/produção de (A) glucose, (B) lactato e (C) glutamina e crescimento celular das células não infectadas.

Metabolitos: 1D9 (■), 1G3 (▲) e HEK293 (◆); crescimento celular: 1D9 (●), 1G3 (●) e HEK293 (●). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

**Quadro 3** – Caracterização do metabolismo celular para as diferentes linhas celulares.

<b>Linha celular</b>	<b><math>q_{Glc}</math> (mmol/ <math>10^{11}</math> célula.h)</b>	<b><math>q_{Lac}</math> (mmol/ <math>10^{11}</math> célula.h)</b>	<b><math>q_{Gln}</math> (mmol/ <math>10^{11}</math> célula.h)</b>	<b><math>Y_{Lac/Glc}</math> (mol/mol)</b>	<b><math>Y_{Glc/Gln}</math> (mol/mol)</b>
<b>1D9</b>	16,1 ± 0,8	25,4 ± 1,2	4,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1	3,8 ± 0,3
<b>1G3</b>	14,0 ± 1,0	23,7 ± 2,6	4,3 ± 0,5	1,7 ± 0,2	3,2 ± 0,4
<b>HEK293</b>	24,5 ± 1,1	38,7 ± 3,3	5,0 ± 0,6	1,6 ± 0,2	4,9 ± 0,6

$q_{Glc}$  - consumo específico de glucose;  $q_{Lac}$  - produção específica de lactato;  $q_{Gln}$  - consumo específico de glutamina;  $Y_{Lac/Glc}$  - razão molar lactato produzido/glucose consumida;  $Y_{Glc/Gln}$  - razão molar glucose consumida/glutamina consumida.

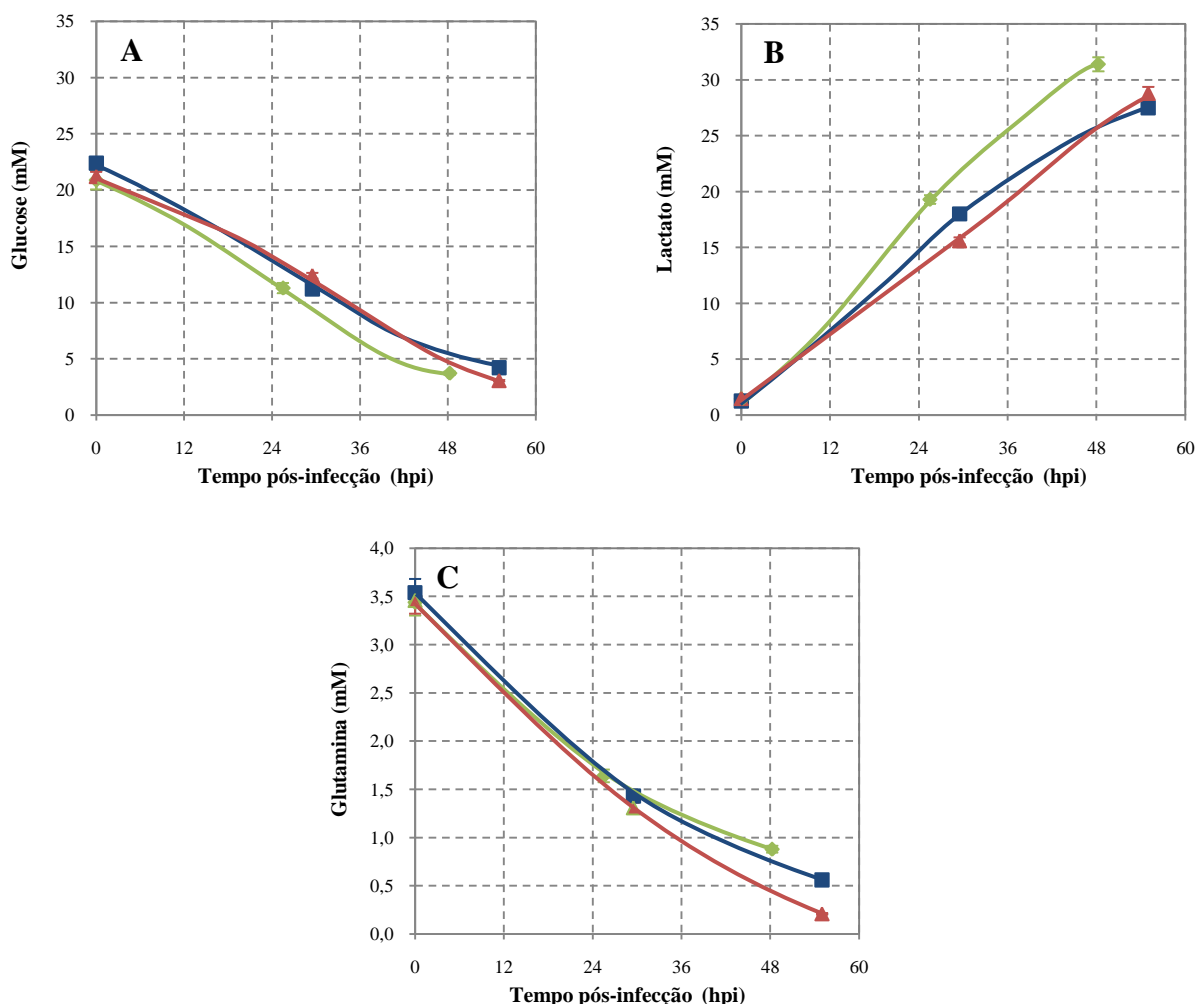
Para as células de mamífero, os consumos de glucose e glutamina dependem directamente das suas concentrações no meio (Ljunggren *et al.*, 1994). Nestes ensaios, observou-se que o consumo de glucose nas células 1D9 e 1G3 foi menor, comparativamente com as células HEK293, reflectindo-se numa menor produção de lactato. O facto de o lactato se tornar tóxico para as células quando em concentrações elevadas (geralmente superior a 20 mM, Amable e Butler, 2008), conduzindo ao decaimento do pH da cultura, pode representar uma séria limitação no crescimento celular. A menor acumulação de lactato nas células 1D9 e 1G3 terá permitido o maior crescimento celular observado, relativamente às células HEK293, para as quais se observou que a concentração de lactato no meio ultrapassou os 20 mM às 72 horas, coincidindo com o final da fase exponencial de crescimento celular. Deste modo, a acumulação de lactato observada para estas células pode ter sido uma das causas que levou à inibição do crescimento celular.

Apesar das diferenças observadas no consumo de glucose e produção de lactato, não foram registadas diferenças na eficiência metabólica entre as três linhas celulares, já que os valores de  $Y_{Lac/Glc}$  não apresentaram diferenças significativas. Estes valores estão de acordo com o descrito na literatura para outras células, como a linha celular BHK (1,5 mol/mol, Cruz *et al.*, 1999) ou para hibridomas (1,6 mol/mol, Ozturk e Palsson, 1991).

Quanto ao consumo de glutamina não foram observadas diferenças significativas para as três linhas celulares. Os valores determinados para as razões molares  $Y_{Glc/Gln}$  das células 1D9 e 1G3 (3,8±0,3 e 3,2±0,2 mol/mol, respectivamente) encontram-se próximo dos valores descritos para outras células de mamífero (1-3 mol/mol, Neermann e Wagner, 1996). Para as células HEK293 observou-se que a razão  $Y_{Glc/Gln}$  foi superior (4,9±0,6 mol/mol), relativamente às células 1D9 e 1G3, encontrando-se dentro do reportado para esta linha celular (5-10 mol/mol, Lee *et al.* 2003; Nadeau *et al.*, 2000). O valor de  $Y_{Glc/Gln}$  mais elevado para a linha celular HEK293 indica que estas células, como fonte de obtenção de energia,

demonstraram uma maior preferência no metabolismo glicolítico, sobre o metabolismo da glutamina, relativamente às células 1D9 e 1G3.

Uma vez que a infecção viral afectou o crescimento celular, foram também analisadas as concentrações de metabolitos após a infecção (figura 10), permitindo determinar as taxas específicas de consumo/produção e as suas razões molares durante este período (quadro 4).



**Figura 10.** Perfis de consumo/produção de (A) glucose, (B) lactato e (C) glutamina das células infectadas.

1D9 (■), 1G3 (▲) e HEK293 (◆) infectadas. As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

**Quadro 4** – Caracterização do metabolismo celular após a infecção para as diferentes linhas celulares.

Linha celular	$q_{\text{Glc}}$ (mmol/ $10^{11}$ célula.h)	$q_{\text{Lac}}$ (mmol/ $10^{11}$ célula.h)	$q_{\text{Gln}}$ (mmol/ $10^{11}$ célula.h)	$Y_{\text{Lac/Glc}}$ (mol/mol)	$Y_{\text{Glc/Gln}}$ (mol/mol)
1D9	$15,8 \pm 1,4$	$22,8 \pm 2,6$	$2,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,2$	$6,1 \pm 1,3$
1G3	$17,4 \pm 0,3$	$26,1 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,1$	$5,6 \pm 1,1$
HEK293	$25,6 \pm 1,6$	$44,6 \pm 4,7$	$3,8 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,2$	$6,7 \pm 1,6$

$q_{\text{Glc}}$  - consumo específico de glucose;  $q_{\text{Lac}}$  - produção específica de lactato;  $q_{\text{Gln}}$  - consumo específico de glutamina;  $Y_{\text{Lac/Glc}}$  - razão molar lactato produzido/glucose consumida;  $Y_{\text{Glc/Gln}}$  - razão molar glucose consumida/glutamina consumida.

Os resultados obtidos após a infecção demonstraram que os consumos de glucose e glutamina e a produção de lactato foram bastante elevados, para as três linhas celulares, ainda que não tenha sido observado crescimento celular neste período. Estes consumos elevados podem estar relacionados com o redireccionamento do metabolismo e maquinaria celular, para a replicação dos rAdVs. Outro factor que poderá ter influenciado os consumos observados é o facto da infecção das culturas celulares ter sido realizada por mudança total do meio de cultura. O consequente aumento das concentrações de glucose e glutamina disponíveis, assim como a remoção de metabolitos tóxicos, após a mudança de meio, poderá também ser responsável pelo elevado consumo destes metabolitos.

A produção de lactato registada, que foi significativamente inferior nas células 1D9 e 1G3 ( $22,8 \pm 2,6$  e  $26,1 \pm 0,5$  mmol/ $10^{11}$  célula/mL, respectivamente) relativamente às células HEK293 ( $44,6 \pm 4,7$  mmol/ $10^{11}$  célula/mL), poderá ser justificada pela própria plasticidade das células em resposta à infecção adenoviral ou pela incapacidade das células em metabolizarem toda a glucose pelo ciclo TCA. A acidificação do meio induzida pela acumulação de lactato, geralmente para valores superiores a 20 mM (Amable et al. 2008) pode ter representado nestes ensaios uma limitação para a produção de rAdVs, já que a produtividade destas partículas virais é bastante sensível aos valores de pH da cultura (Jardon e Garnier, 2003).

Durante a infecção, de acordo com os valores de  $Y_{\text{Lac/Glc}}$ , não foram registadas diferenças significativas quanto à eficiência do metabolismo glicolítico para as três linhas celulares.

O consumo de glutamina, após a infecção, foi superior para as células 1D9 e 1G3, em relação às células HEK293, levando à sua depleção no meio. Para o metabolismo celular e, consequentemente, para a produção viral é importante que não se verifiquem limitações nutricionais deste aminoácido, devido à sua importância como principal fonte de azoto para as células (revisto por Gódia e Cairó, 2006). A depleção de glutamina observada para estas células poderá ter limitado a produção de rAdVs, contribuindo em parte para a menor produtividade registada, relativamente às células HEK293. Contudo, analisando as razões  $Y_{\text{Glc/Gln}}$ , observou-se que durante a infecção, as três linhas celulares demonstraram maior preferência no metabolismo da glucose, relativamente à glutamina, para obtenção de energia, quando em comparação com o registado para a fase de crescimento celular das células não infectadas.

Para o sistema estático e nas condições utilizadas, as células 1D9 e 1G3, apesar de apresentarem um crescimento celular mais eficiente e menor produção de lactato, registaram produtividades de partículas infecciosas significativamente inferiores, comparativamente com

as células HEK293. Ainda assim, de entre as duas novas linhas celulares, foram as células 1G3 que apresentaram melhor eficiência nos ensaios de produção de partículas infecciosas. Desta forma, esta linha celular foi seleccionada para prosseguir os ensaios em sistema agitado.

### 3.2. Sistema Agitado

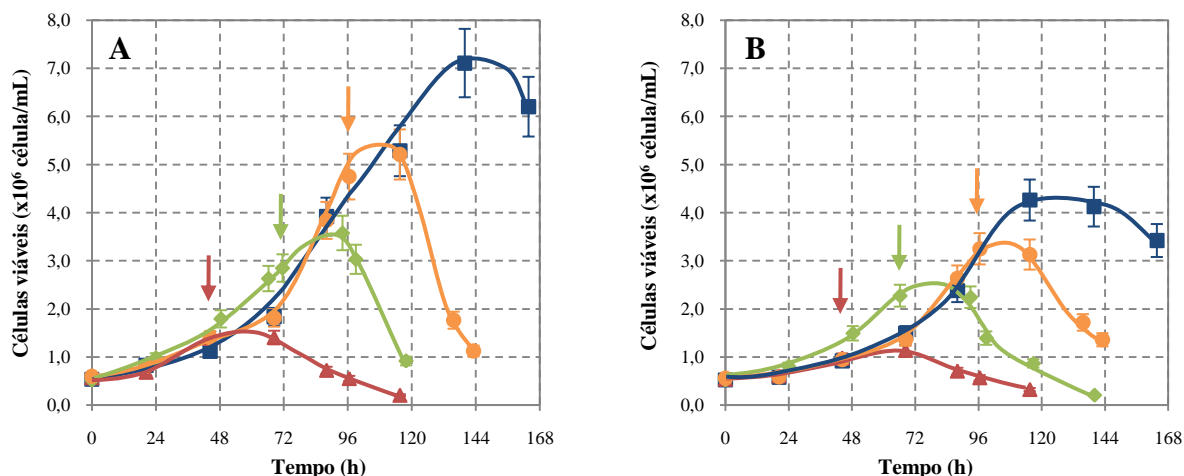
Os estudos para sistema agitado foram realizados em Erlenmeyer, utilizando como meio de cultura o meio definido Ex-Cell, que dispensa adição de FBS, permitindo eliminar todos os problemas associados à sua utilização (revisto por van der Valk *et al.*, 2010). O sistema agitado representa uma vantagem significativa no que confere ao aumento de escala do processo, sendo que se aproxima mais dos sistemas de produção em bioreactores de larga escala, comparativamente com o sistema estático. Torna-se assim um sistema com vantagens práticas, de modo a identificar parâmetros críticos para o aumento de escala do sistema de produção de rAdVs.

Durante a realização das várias culturas celulares foi possível monitorizar os valores de pH e pO<sub>2</sub> ao longo do tempo, através da utilização de uma unidade *Shake Flask Reader*. A monitorização em tempo real destes parâmetros pode constituir um importante auxílio para a identificação de possíveis limitações no processo de produção viral. A monitorização dos valores de pH e pO<sub>2</sub> é normalmente efectuada em culturas realizadas em bioreactores, que adicionalmente permitem controlar estes parâmetros, mantendo-os nos valores óptimos. No entanto, esta monitorização, em sistemas de cultura utilizando Erlenmeyers, não tem sido geralmente efectuada, já que não existem eléctrodos adaptados a Erlenmeyer, sendo que os restantes sistemas de monitorização disponíveis são invasivos, o que pode conduzir a problemas de contaminantes. A utilização da unidade *Shake Flask Reader* garantiu a monitorização de pH e pO<sub>2</sub> de uma forma simples e não invasiva. Em trabalhos publicados anteriormente, foi descrita a utilização desta unidade para monitorização de culturas de microorganismos (Schneider *et al.*, 2010), tendo sido utilizada pela primeira vez para estudos de infecção por rAdVs neste trabalho.

Tal como realizado para o sistema estático, estes ensaios tiveram como objectivo caracterizar o comportamento celular neste sistema e nas condições de cultura utilizadas. O comportamento das células 1G3, relativamente ao crescimento celular, metabolismo e produção de partículas infecciosas, foi analisado na perspectiva da sua utilização como alternativa às células HEK293.

### 3.2.1. Caracterização do crescimento celular

Os perfis de crescimento celular obtidos para as células 1G3 e HEK293 encontram-se representados na figura 11. Os parâmetros de crescimento celular  $\mu_{\max}$  e  $t_d$ , determinados através dos perfis obtidos, encontram-se no quadro 5.



**Figura 11.** Perfis de crescimento das células (A) 1G3 e (B) HEK293.

1G3: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 3 (◆) e CCI 5 (●); HEK293: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 2 (◆) e CCI 3 (●). O momento das várias infecções encontra-se representado pelas setas (↓). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

**Quadro 5** – Caracterização do crescimento celular para as células 1G3 e HEK293.

Linha celular	$X_{V_{\max}}$ ( $\times 10^6$ células/mL)	$\mu_{\max}$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)
1G3	$7,7 \pm 0,8$	$0,026 \pm 0,003$	$27,0 \pm 3,1$
HEK293	$4,3 \pm 0,4$	$0,021 \pm 0,001$	$32,0 \pm 1,1$

$X_{V_{\max}}$  – concentração máxima de células viáveis;  $\mu_{\max}$  – taxa específica de crescimento;  $t_d$  – tempo de duplicação.

Em sistema agitado observou-se que as células 1G3 alcançaram densidades celulares significativamente superiores às registadas para as células HEK293. Nestes ensaios, o valor de  $X_{V_{\max}}$  registado para as células 1G3 ( $7,7 \pm 0,8 \times 10^6$  célula/mL) foi aproximadamente duas vezes superior ao registado para as células HEK293 ( $4,3 \pm 0,4 \times 10^6$  célula/mL). Para além disso, as células 1G3 demonstraram um crescimento celular mais rápido ( $t_d$  de  $27,0 \pm 3,1$  horas), relativamente às células HEK293 ( $t_d$  de  $32,0 \pm 1,1$  horas). Neste trabalho, os valores de  $X_{V_{\max}}$  obtidos para as células HEK293 foram significativamente menores ao anteriormente descrito para o meio Ex-Cell ( $7,4 \times 10^6$  célula/mL, Ferreira et al. 2005c), ainda que o valor de  $\mu_{\max}$  esteja de acordo. Estes resultados podem-se explicar pelo menor número de passagens das células utilizadas neste trabalho, já que a adaptação ao crescimento em suspensão foi realizada há menos tempo, de modo a ter as células HEK293 e 1G3 com o mesmo número de

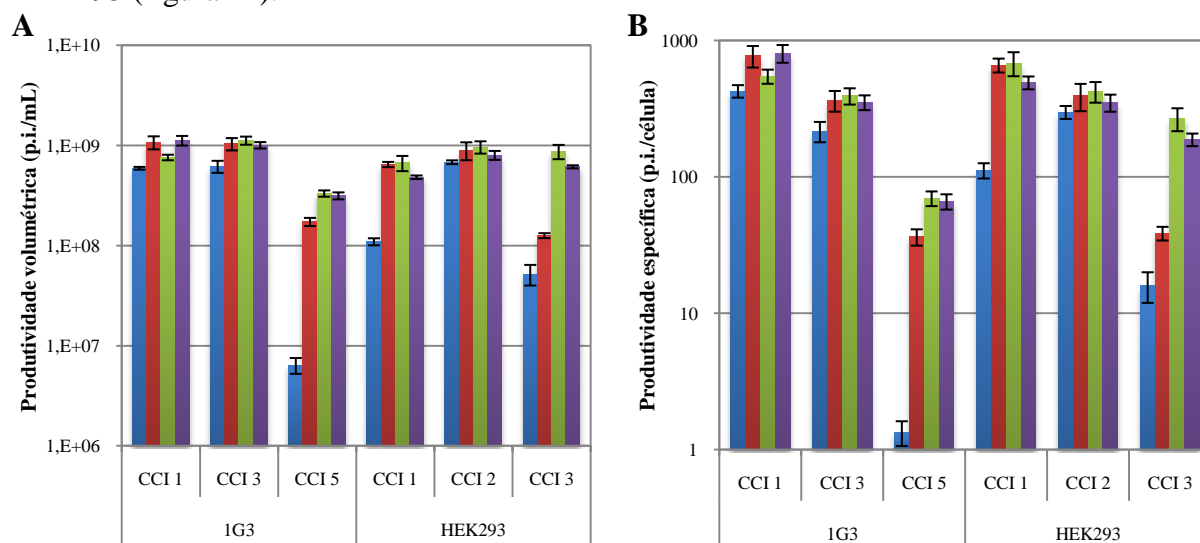
passagens. O número de passagens de uma cultura celular pode influenciar significativamente os parâmetros de crescimento celular (Park *et al.*, 2004), tendo sido inclusivamente observado que as mesmas células utilizadas nestes ensaios, ao final de um maior número de passagens apresentaram valores de  $X_{v_{max}}$  próximos dos reportados por Ferreira *et al.* (2005c), demonstrando que as células HEK293 demoraram mais tempo a adaptar-se completamente a este meio de cultura.

A produção de rAdVs, para as células HEK293, encontra-se limitada à utilização de um valor de CCI de  $1-2 \times 10^6$  célula/mL, observando-se uma significativa quebra na produtividade específica para CCIs superiores (Kamen e Henry, 2004; Nadeau e Kamen, 2003). Como tal, para este trabalho, pretendeu-se avaliar o chamado “efeito da densidade celular” também nas células 1G3. As células foram infectadas em diferentes CCIs, sendo que as diferenças no crescimento observadas entre as duas linhas celulares, permitiram testar a produção de rAdVs nas células 1G3 para valores superiores de CCI. Deste modo, foram testadas CCIs de  $1 \times 10^6$  (CCI 1),  $3 \times 10^6$  (CCI 3) e  $5 \times 10^6$  célula/mL (CCI 5), para as células 1G3, e  $1 \times 10^6$  (CCI 1),  $2 \times 10^6$  (CCI 2) e  $3 \times 10^6$  célula/mL (CCI 3) para as HEK293.

Nos perfis de crescimento celular nas várias condições de infecção, para ambas linhas celulares, observou-se que a infecção inibiu o crescimento, tal como para o sistema estático. Após um período de 24 hpi, observa-se uma fase de morte celular, em consequência da lise celular induzida no final do ciclo infeccioso dos rAdVs (Stone *et al.*, 2000).

### 3.2.2. Produção de partículas infecciosas

As diferentes condições de infecção utilizadas neste trabalho permitiram analisar o efeito da CCI na produção volumétrica e específica de partículas infecciosas, para as células 1G3 e HEK293 (figura 12).



**Figura 12.** Produção (A) volumétrica e (B) específica de partículas infecciosas às 24 (■), 36 (■), 48 (■) e 72 hpi (■), nas duas linhas celulares.

Em sistema agitado e nas condições utilizadas, a produção de partículas infecciosas foi mais eficiente para as células 1G3, registrando-se produtividades específicas superiores às das células HEK293.

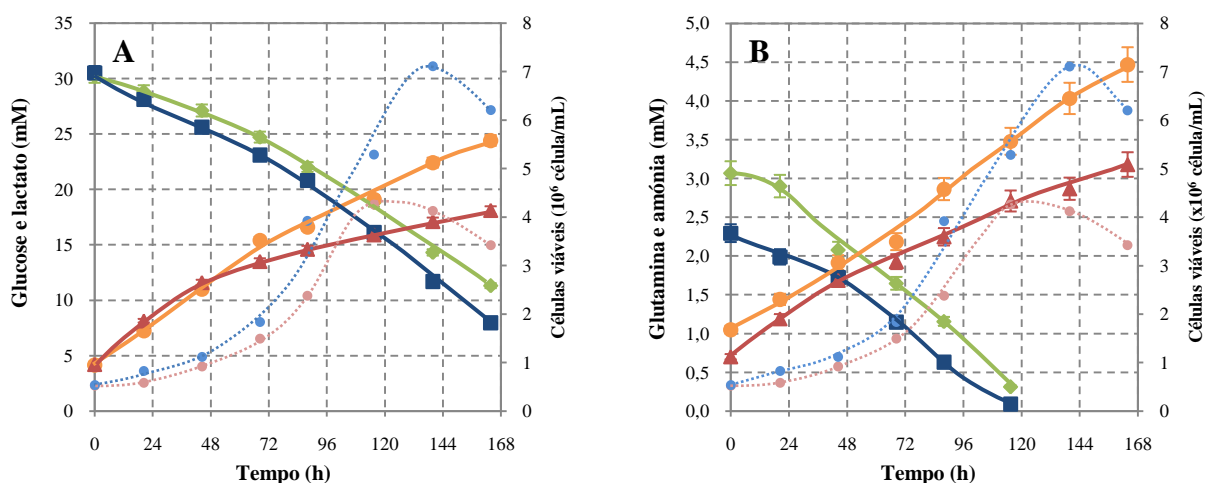
Analisando os diferentes tempos de recolha utilizados para a análise de partículas infecciosas, verificou-se que a produtividade máxima foi obtida às 48 hpi, tal como descrito anteriormente para as células HEK293, utilizando uma MOI de 5 (Ferreira et al. 2005b).

Tal como anteriormente reportado para as células HEK293 (Kamen e Henry, 2004; Nadeau e Kamen, 2003), observou-se uma significativa quebra na produção específica máxima para as infecções a CCIs superiores a  $1 \times 10^6$  célula/mL, registando-se valores de  $682 \pm 136$ ,  $422 \pm 73$  e  $267 \pm 51$  p.i./célula, respectivamente para CCI 1, 2 e 3. No caso das células 1G3, também foi observada uma quebra significativa na produção específica para as infecções a CCI 3 e 5, com valores de  $804 \pm 120$ ,  $392 \pm 54$  e  $69 \pm 9$  p.i./célula, respectivamente para CCI 1, 3 e 5. No entanto, a infecção a CCI 3, nas células 1G3, permitiu a maior produtividade volumétrica observada nestes ensaios.

Os resultados obtidos para a produção de rAdVs, neste trabalho, foram inferiores ao descrito anteriormente para as células HEK293 em Erlenmeyer (Ferreira *et al.*, 2005c), o que pode ser justificável pelas diferentes condições utilizadas neste trabalho, tais como o meio de cultura, os vectores utilizados e os métodos para titulação de partículas infecciosas.

### 3.2.3. Caracterização do metabolismo celular

A determinação dos perfis de consumo/produção de metabolitos (figura 13), permitiu o cálculo das taxas específicas de consumo/produção dos diferentes metabolitos, assim como de algumas razões molares representativas da eficiência metabólica das células (quadro 6).



**Figura 13.** Perfis de consumo/produção de (A) glucose, lactato, (B) glutamina e amónia e crescimento celular das células não infectadas.

Glucose e Glutamina: 1G3 (■) e HEK293 (◆); Lactato e amónia: 1G3 (▲) e HEK293 (●); crescimento celular: 1G3 (●) e HEK293 (●). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.



**Quadro 6** – Caracterização do metabolismo celular para as células 1G3 e HEK293, não infectadas.

<b>Linha celular</b>	<b>q<sub>Glc</sub> (mmol/10<sup>11</sup> célula.h)</b>	<b>q<sub>Lac</sub> (mmol/10<sup>11</sup> célula.h)</b>	<b>q<sub>Gln</sub> (mmol/10<sup>11</sup> célula.h)</b>	<b>q<sub>NH4+</sub> (mmol/10<sup>11</sup> célula.h)</b>	<b>Y<sub>Lac/Glc</sub> (mol/mol)</b>	<b>Y<sub>Glc/Gln</sub> (mol/mol)</b>	<b>Y<sub>NH4+/Gln</sub> (mol/mol)</b>
<b>1G3</b>	9,9 ± 1,3	12,1 ± 3,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,4	6,5 ± 1,0	1,1 ± 0,3
<b>HEK293</b>	8,0 ± 0,3	10,8 ± 2,8	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,4	4,2 ± 0,9	0,8 ± 0,2

q<sub>Glc</sub> - consumo específico de glucose; q<sub>Lac</sub> – produção específica de lactato; q<sub>Gln</sub> – consumo específico de glutamina; q<sub>NH4+</sub> – produção específica de amônia; Y<sub>Lac/Glc</sub> – razão molar lactato produzido/glucose consumida; Y<sub>Glc/Gln</sub> – razão molar glucose consumida/glutamina consumida; Y<sub>NH4+/Gln</sub> – razão molar amônia produzida/glutamina consumida.

Os resultados obtidos para estes ensaios, demonstraram não existir diferenças significativas no consumo de glucose entre as células 1G3 e HEK293 (9,9±1,3 e 9,3±0,5 mmol/10<sup>11</sup>célula.h, respectivamente), assim como para a produção de lactato (12,1±3,1 e 10,8±2,8 mmol/10<sup>11</sup>célula.h, respectivamente). Contudo, a acumulação de lactato no meio atingiu concentrações mais elevadas nas células HEK293. Desta forma, também não foram observadas diferenças significativas quanto à eficiência do metabolismo glicolítico, para as duas linhas celulares, apresentando valores de Y<sub>Lac/Glc</sub> de 1,2±0,4 e 1,4±0,4 mol/mol, respectivamente para as células 1G3 e HEK293. Os valores obtidos para as células HEK293 encontram-se na ordem de grandeza do que foi descrito por Nadeau *et al.* (2002) para estas células em diferentes meios de cultura (1-2 mol/mol).

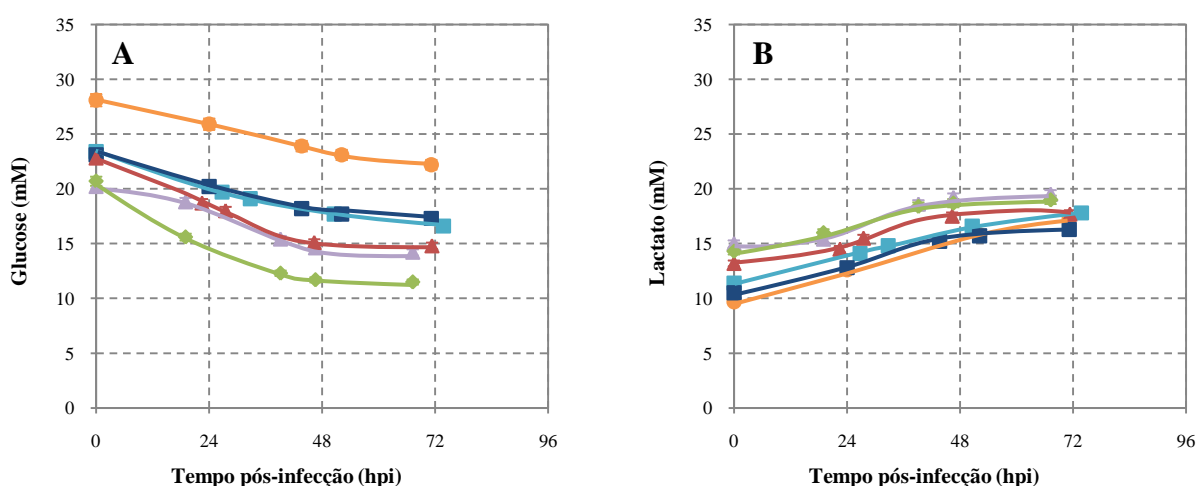
Os consumos de glutamina registados nestes ensaios, não demonstraram existir diferenças significativas entre as duas linhas celulares (1,5±0,1 e 1,9±0,4 mmol/10<sup>11</sup>célula.h, respectivamente para as células 1G3 e HEK293). O mesmo foi observado para a produção de amônia, onde foram obtidos valores de 1,6±0,4 e 1,6±0,2 mmol/10<sup>11</sup>célula.h para as células 1G3 e HEK293, respectivamente. Porém, a acumulação de amônia no meio foi superior nas células HEK293. Os valores calculados para a razão Y<sub>NH4+/Gln</sub> não apresentaram igualmente diferenças significativas entre as duas células, indicando uma eficiência metabólica de glutamina semelhante. O valor de Y<sub>NH4+/Gln</sub> determinado para as células HEK293 (0,8 ± 0,2 mol/mol) está de acordo com o previamente reportado para estas células (Ferreira *et al.*, 2005a; Nadeau *et al.*, 2000).

Neste estudo, os valores determinados para a razão molar Y<sub>Glc/Gln</sub> das células 1G3 e HEK293 também não apresentaram diferenças significativas (6,5±1,0 e 4,2±0,9 mol/mol, respectivamente). Os valores de Y<sub>Glc/Gln</sub> determinados neste trabalho para as duas linhas celulares foram superior aos valores descritos para grande maioria das células de mamífero

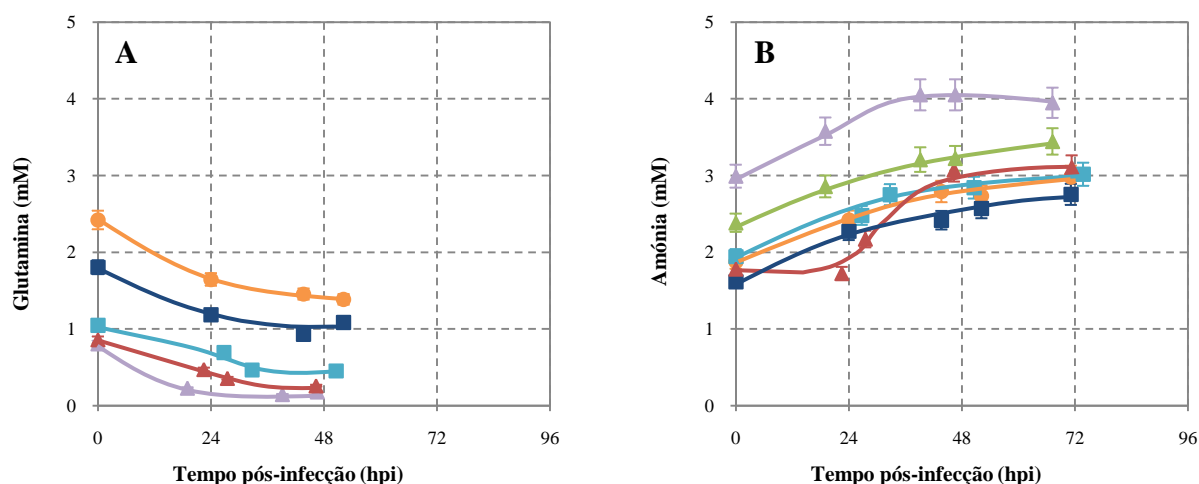
(1-3 mol/mol, Neermann e Wagner, 1996), no entanto estão de acordo com os valores reportados para as células PER.C6™ (6-8 mol/mol Maranga e Goochee, 2006) e HEK293 (5-10 mol/mol Lee *et al.*, 2003; Nadeau *et al.*, 2000).

A acumulação de lactato e amónia nas culturas pode inibir o crescimento celular quando em concentrações elevadas (em geral 20 e 2-5 mM, respectivamente, Amable e Butler, 2008; Cruz *et al.*, 2000). Assim, as diferenças observadas na acumulação de lactato e amónia no meio de cultura podem, em parte, justificar os diferentes perfis de crescimento celular. No caso das células 1G3 a concentração de lactato não atingiu os 20 mM, no entanto, observou-se que a concentração de amónia superou os 3 mM após 144 horas, onde se registou o final do crescimento celular, indicando a influência deste metabolito no crescimento celular. Para as células HEK293 observou-se que as concentrações de lactato e amónia atingiram valores superiores a 20 e 3 mM, respectivamente, após 120 horas, coincidindo com o final da fase exponencial do crescimento celular. Desta forma a acumulação destes metabolitos pode ter sido um dos factores que provocaram a inibição do crescimento celular. Nestes ensaios, a depleção de glutamina observada às 120 horas poderá ser outro factor que terá contribuído para a limitação do crescimento celular, devido à sua importância como fonte de energia e de azoto.

Neste trabalho foram ainda determinados os perfis de metabolismo celular, após a infecção das culturas celulares a diferentes CCIs (figura 14 e 15).



**Figura 14.** Perfis de consumo/produção de (A) glucose e (B) lactato das células infectadas. 1G3: CCI 1 (■), CCI 3 (▲) e CCI 5 (◆); HEK293: CCI 1 (●), CCI 2 (■) e CCI 3 (▲). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.



**Figura 15.** Perfis de consumo/produção de (A) glutamina e (B) amônia das células infectadas.

1G3: CCI 1 (■), CCI 3 (▲) e CCI 5 (◆); HEK293: CCI 1 (●), CCI 2 (■) e CCI 3 (▲). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

Na altura da infecção, não se observou qualquer limitação nutricional no que respeita à glucose, já que não foi observada a depleção deste metabolito em nenhuma das condições testadas. O mesmo não sucedeu com a glutamina, já que para as infecções a CCIs mais elevadas (CCI 3 e 5) observou-se a depleção deste metabolito em menos de 48 hpi. Neste trabalho os valores de concentração de glutamina para as células 1G3 infectadas a CCI 5 encontravam-se abaixo do nível de detecção do método utilizado.

A limitação de glutamina observada poderá constituir uma das razões para a quebra na produtividade específica observada para as CCIs mais elevadas, já que se trata da principal fonte de azoto para as células (revisto por Gódia e Cairó, 2006). Uma possível estratégia para ultrapassar esta limitação seria a suplementação do meio com uma concentração de glutamina superior. No entanto, esta estratégia poderia diminuir a eficiência do metabolismo da glutamina, favorecendo a produção de amónia (Maranga et al. 2006). Por conseguinte, a solução mais eficaz poderá passar por uma nova suplementação do meio no momento da infecção, para as CCIs mais elevadas.

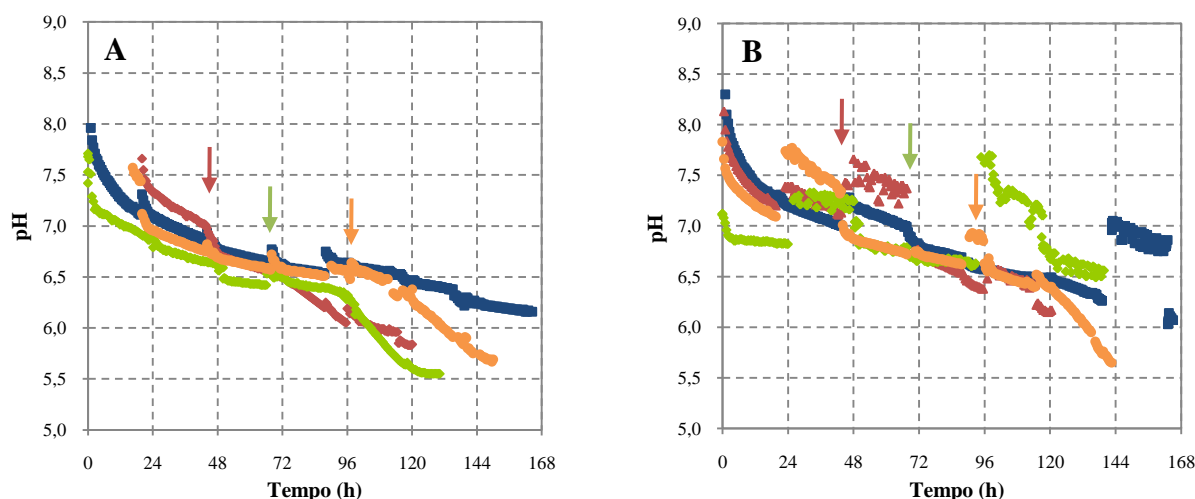
Quanto à produção de lactato pelas células, observou-se que em todas as condições, para ambas as linhas celulares, a sua concentração manteve-se inferior ao valor crítico, referido anteriormente de 20 mM, que pode contribuir para a acidificação do meio e consequente quebra na produtividade viral.

Para as células 1G3 observou-se que acumulação de amónia foi menor, comparativamente com as células HEK293. Para estas células, encontra-se descrito que concentrações de amónia superiores a 2 mM podem inibir a produção viral (Ferreira *et al.*, 2005a). Uma vez que as concentrações deste metabolito atingiram valores superiores a 2 mM, para todas as condições de infecção, poderá representar uma limitação para a produção viral. As estratégias descritas para diminuir a produção de amónia compreendem a redução da concentração de glutamina para níveis mínimos em cultura que não afectem o crescimento celular (Ljunggren e Häggström, 1994), a utilização substituintes de glutamina, como dipéptidos (alanil-glutamina e glicil-glutamina, por exemplo) (Christie *et al.* 1994) ou glutamato (Ferreira *et al.*, 2005a). No caso do presente trabalho, a redução da concentração de glutamina não seria viável, visto a concentração utilizada ser potencialmente limitante. Assim sendo, a possível estratégia para diminuição da produção de amónia passaria pela utilização de glutamato ou dipéptidos substituintes de glutamina, sendo que actualmente estão disponíveis comercialmente várias formulações para o efeito.

#### 3.2.4. Monitorização de pH

Os valores de pH numa cultura celular carecem de um controlo eficiente, de modo a assegurar a sua manutenção em valores próximos dos fisiológicos. As variações no pH podem afectar significativamente o crescimento e a viabilidade celular, assim como a produção de rAdVs. O pH óptimo para cultura de células de mamífero encontra-se, geralmente, em valores entre 7,0 e 7,4, sendo que para algumas linhas celulares observa-se inibição do crescimento celular para valores abaixo de 6,8 (revisto por Griffiths, 2000). Para a produção de rAdVs torna-se fundamental o controlo eficiente do pH da cultura, tendo sido descrito anteriormente para células HEK293 que, embora o crescimento celular não seja afectado significativamente para valores entre 6,7 e 7,7, a produção viral pode ser fortemente inibida para pH inferior ou superior a 7,2 (Jardon *et al.* 2003).

A monitorização dos valores de pH das várias culturas, através da utilização da unidade *Shake Flask Reader*, permitiu observar a sua evolução ao longo do tempo, representada na figura 16.



**Figura 16.** Perfis dos valores de pH das culturas, ao longo do tempo, para as células (A) 1G3 e (B) HEK293.

1G3: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 3 (◆) e CCI 5 (●); HEK293: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 2 (◆) e CCI 3 (●). O momento das várias infecções encontra-se representado pelas setas (↓).

Analisando os resultados, foi possível observar um constante decaimento dos valores de pH, ao longo do tempo, para todas as culturas celulares. Para as células 1G3 não infectadas o final do crescimento celular sucedeu às 144 horas (figura 11.A), onde se registaram valores de pH de 6,3. Já para as células HEK293 não infectadas, o final do crescimento celular ocorreu às 120 horas (figura 11.B), onde se observou que o pH atinge valores inferiores a 6,5. Desta forma, sendo os valores de pH baixos uma das causas para a inibição do crescimento celular, observou-se que as células 1G3 apresentaram uma sensibilidade menor à acidificação do meio, quanto ao seu crescimento.

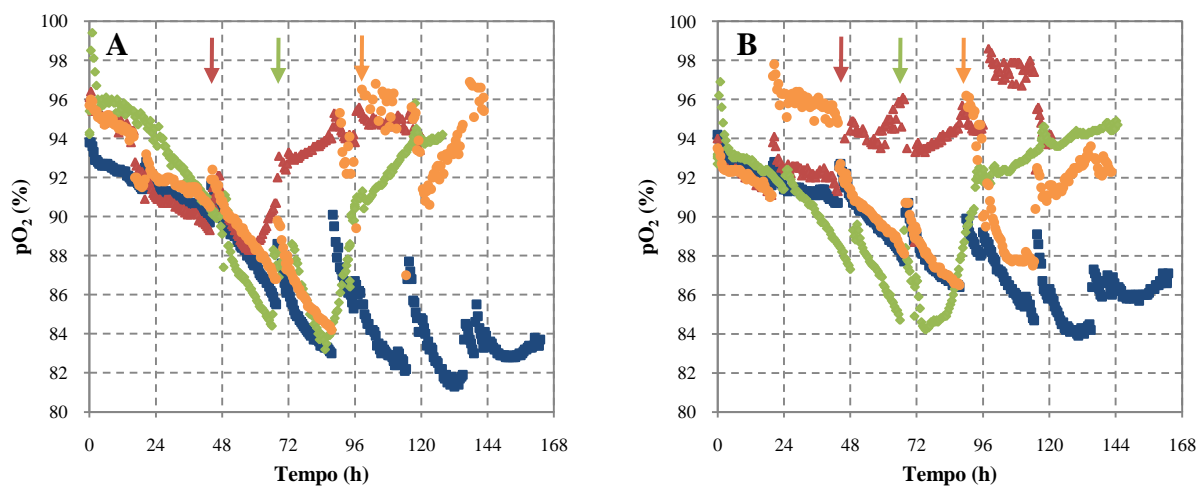
Foi possível observar que apenas quando as células foram infectadas a CCI 1 as culturas apresentavam pH próximo de 7,0, descendo rapidamente após a infecção. Portanto, os valores de pH demasiado ácidos podem também ter sido responsáveis pela quebra observada na produtividade viral para infecções realizadas a CCIs elevadas.

Os perfis de pH das culturas obtidos apresentaram algumas oscilações ao longo do tempo, o que se deve ao facto de cada Erlenmeyer ser retirado da unidade *Shake Flask Reader*, para recolha de amostras, e recolocado novamente, o que provoca oscilações nos valores devido a ligeiras mudanças de posição, no que concerne ao alinhamento dos sensores ópticos.

Numa perspectiva de desenvolvimento de um sistema de produção viral em maior escala, estes resultados confirmam a necessidade absoluta de um sistema de controlo eficiente de pH, que possa manter a cultura em valores próximos dos fisiológicos.

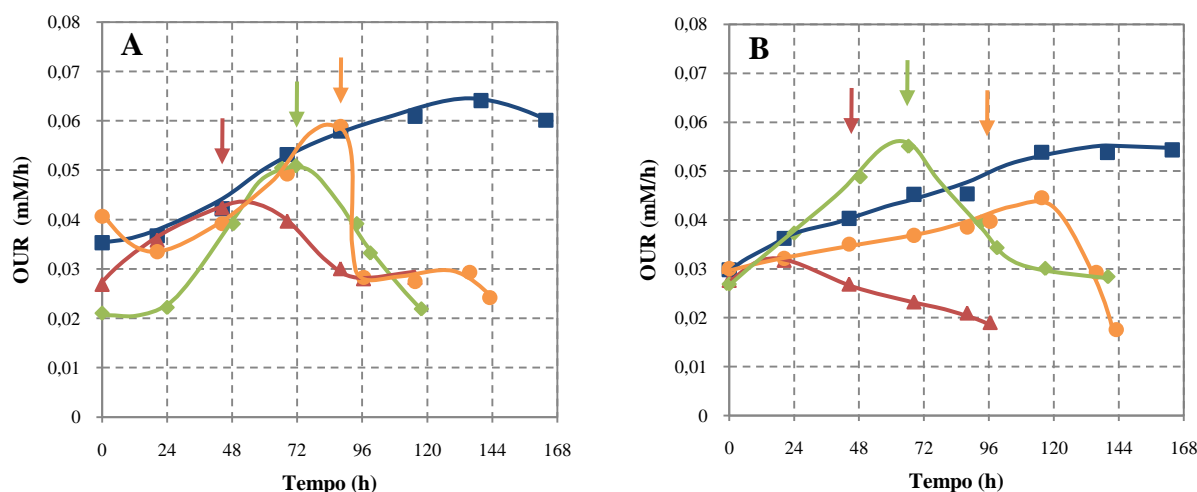
### 3.2.5. Monitorização de $pO_2$

A monitorização dos valores de  $pO_2$  permitiu não só obter um perfil ao longo do tempo (figura 17), mas também determinar parâmetros importantes para as culturas celulares, como a taxa de consumo de oxigénio (OUR) (figura 18) e o consumo específico de oxigénio ( $q_{O_2}$ ) (quadro 7).



**Figura 17.** Perfis dos valores de  $pO_2$  ao longo do tempo das culturas de células (A) 1G3 e (B) HEK293.

1G3: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 3 (◆) e CCI 5 (●); HEK293: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 2 (◆) e CCI 3 (●). O momento das várias infeções encontra-se representado pelas setas (↓).



**Figura 18.** Perfis dos valores de OUR ao longo do tempo das culturas de células (A) 1G3 e (B) HEK293.

1G3: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 3 (◆) e CCI 5 (●); HEK293: não infectadas (■), infectadas a CCI 1 (▲), CCI 2 (◆) e CCI 3 (●). O momento das várias infeções encontra-se representado pelas setas (↓). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

**Quadro 7** – Caracterização do metabolismo celular oxidativo para as células 1G3 e HEK293, não infectadas.

<b>Linha celular</b>	<b><math>q_{O_2}</math> (mmol/10<sup>11</sup> célula.h)</b>	<b><math>Y_{O_2/Glc}</math> (mol/mol)</b>	<b><math>Y_{O_2/Gln}</math> (mol/mol)</b>
<b>1G3</b>	4,4 ± 0,7	0,4 ± 0,1	2,9 ± 0,5
<b>HEK293</b>	3,9 ± 0,6	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,5

$q_{O_2}$  - consumo específico de oxigénio;  $Y_{O_2/Glc}$  – razão molar oxigénio consumido/glucose consumida;  $Y_{O_2/Gln}$  – razão molar oxigénio consumido/glutamina consumida.

Os perfis de  $pO_2$  obtidos nestes ensaios permitiram observar que não houve limitações de  $O_2$  para nenhuma das culturas celulares, já que os valores registados foram sempre superiores a 80%.

Nas células não infectadas, em ambas as linhas celulares, observou-se que os valores de OUR calculados aumentaram ao longo do tempo de forma consistente com o observado para o crescimento celular. Com o final do crescimento celular, às 144 e 120 horas, respectivamente para as células 1G3 e HEK293 (figura 10), os valores de OUR estabilizaram. Para as células 1G3 observou-se que atingiram valores de OUR mais elevados do que os registados para as células HEK293, indicando um consumo de oxigénio superior nas culturas destas células. No entanto, analisando os valores de  $q_{O_2}$  calculados ( $4,4 \pm 0,7$  e  $3,9 \pm 0,6$  mmol/10<sup>11</sup>célula.h, respectivamente para as células 1G3 e HEK293), não se observaram diferenças significativas, o que sugere que não existiram diferenças quanto à respiração celular. Portanto, foi possível concluir que o maior consumo de oxigénio das células 1G3, comparativamente com as células HEK293, se deve à superior densidade celular registada, sendo o consumo específico de oxigénio por célula semelhante para as duas linhas celulares.

Os valores de  $q_{O_2}$  determinados neste trabalho, foram inferiores ao descrito para outras células de mamífero (10-20 mmol/10<sup>11</sup>célula.h, Maranga e Goochee, 2006; Ruffieux *et al.*, 1998), no entanto, estes valores variam entre linhas celulares diferentes. Do mesmo modo, também as condições e o sistema de cultura podem influenciar estes valores, por exemplo, a utilização de um meio de cultura com maior concentração de glucose pode levar a valores menores de  $q_{O_2}$  (Cruz et al. 1999).

Quanto à eficiência do metabolismo oxidativo da glucose e glutamina também não foram observadas diferenças significativas, registando-se valores de  $Y_{O_2/Glc}$  de  $0,4 \pm 0,1$  e  $0,5 \pm 0,1$  mol/mol e de  $Y_{O_2/Gln}$  de  $2,9 \pm 0,5$  e  $2,1 \pm 0,5$  mol/mol, respectivamente para as células 1G3 e HEK293.

Os perfis de  $pO_2$  obtidos apresentaram algumas oscilações ao longo do tempo, tal como para os valores de pH, devido às pequenas diferenças no alinhamento dos sensores.

Para as células infectadas observou-se, tanto nas células 1G3 como nas HEK293, que após o momento da infecção os valores de OUR diminuem rapidamente. Esta quebra no consumo de oxigénio verificou-se em todas as condições de infecção realizadas, o que indica claramente que a infecção pelos vectores adenovirais provocou um forte abrandamento no metabolismo celular oxidativo. Esta observação está de acordo com o reportado anteriormente para processos de produção de rAdVs em bioreactor, demonstrando que os valores de OUR podem ser um bom indicador do crescimento celular e infecção viral (Kussow *et al.*, 1995).

A realização destes ensaios utilizando a unidade *Shake Flask Reader* permitiu demonstrar que de facto a sua utilização pode constituir uma mais-valia em termos tecnológicos para o desenvolvimento de bio-processos, utilizando Erlenmeyers que são de fácil manuseamento e comportam custos relativamente reduzidos, comparativamente a outros sistemas. A facilidade de utilização deste equipamento e o facto de permitir monitorizar várias culturas em paralelo permite testar várias condições distintas simultaneamente, possibilitando a optimização das condições do processo estudado, reduzindo significativamente o tempo necessário para tal.

As várias análises realizadas para estes ensaios permitem deduzir que a quebra nas produtividades específicas observadas para CCIs superiores, conhecido como o “efeito da densidade celular”, se deveu à acção conjunta de múltiplos factores que contribuíram para a limitação da produção viral, tal como descrito na literatura (Kamen e Henry, 2004; Nadeau e Kamen, 2003). Neste trabalho confirmou-se a influência de alguns factores nesta limitação, entre os quais: (i) a acumulação de amónia; (ii) a limitação de glutamina; (iii) o pH demasiado ácido; (iv) as elevadas concentrações de  $O_2$ .

Contudo, este trabalho demonstrou ser possível infectar as células 1G3 a CCIs mais elevadas sem comprometer de forma crítica a produção específica, permitindo produtividades volumétricas superiores, relativamente ao observado para as células HEK293. Numa perspectiva de aumento de escala do processo de produção para, por exemplo, bioreactor, este poderá ser um factor importante. Com a capacidade de controlar parâmetros críticos, como o  $pO_2$  ou o pH, e garantindo a ausência de limitações nutricionais, nomeadamente de glutamina, poderá ser possível maximizar a produtividade específica a CCIs mais elevados, conseguindo-se produtividades volumétricas significativamente superiores, comparativamente ao actualmente obtido para as células HEK293.



### 3.3. Comparação entre sistema estático e agitado

Neste trabalho foram avaliados e caracterizados os comportamentos das linhas celulares HEK293 e 1G3 em dois sistemas de cultura bastante distintos. O comportamento das células foi avaliado em termos de crescimento celular, metabolismo e produção de rAdVs (quadro 8).

**Quadro 8** – Caracterização do comportamento das células 1G3 e HEK293 em sistema estático e agitado.

Linha celular	1G3		HEK293	
Sistema de cultura	Estático	Agitado	Estático	Agitado
$t_d$	$23,8 \pm 0,5$	$27,0 \pm 3,1$	$23,0 \pm 0,4$	$32,0 \pm 1,1$
$Y_{Lac/Glc}$	$1,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$
$Y_{Glc/Gln}$	$3,2 \pm 0,4$	$6,5 \pm 1,0$	$4,9 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,9$
$rAdV_{max}$	$1699 \pm 580$	$804 \pm 120$	$4127 \pm 589$	$682 \pm 136$

$t_d$  – tempo de duplicação;  $Y_{Lac/Glc}$  – razão molar lactato produzido/glucose consumida;  $Y_{Glc/Gln}$  – razão molar glucose consumida/glutamina consumida;  $rAdV_{max}$  – produtividade específica máxima.

Analisando os resultados obtidos para os dois sistemas de cultura, observou-se que o crescimento celular foi mais lento para o sistema agitado, em ambas as linhas celulares, apresentando valores de  $t_d$  superiores, relativamente aos calculados para o sistema estático. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, sendo que a generalidade das linhas celulares crescem de forma mais eficiente quando aderentes a uma superfície (revisto por Griffiths 2000).

Quanto ao metabolismo celular, avaliando os valores calculados para a razão  $Y_{Lac/Glc}$ , não se observaram diferenças significativas quanto à eficiência do metabolismo da glucose, entre os dois sistemas. Em sistema estático, as células 1G3 apresentaram um valor de  $Y_{Glc/Gln}$  significativamente inferior ao calculado para o sistema agitado ( $3,2 \pm 0,4$  e  $6,5 \pm 1,0$  mol/mol, respectivamente), indicando menor preferência no consumo de glucose, como fonte de obtenção de energia, sobre a glutamina, para estas culturas. Estes resultados estão de acordo com o que seria espectável, visto que o meio DMEM utilizado em sistema estático apresenta menor concentração de glucose comparativamente ao meio Ex-Cell (20mM e 30mM, respectivamente). Em relação às células HEK293 não foram observadas diferenças significativas nos valores de  $Y_{Glc/Gln}$  entre o sistema estático e agitado ( $4,9 \pm 0,6$  e  $4,2 \pm 0,9$ , respectivamente).

Os resultados obtidos para as produções de partículas infecciosas, em ambos os sistemas de cultura, demonstraram que a produtividade específica máxima foi significativamente superior em sistema estático, para ambas as linhas celulares, tal como descrito na literatura (revisto por Nadeau e Kamen, 2003). No entanto, as produtividades volumétricas em sistema estático são limitadas pela área da superfície de cultura, tornando difícil o aumento de escala para volumes e densidades celulares superiores (revisto por Kamen et al. 2004).

### **3.4. Influência da morte celular e internalização de rAdVs para a produção viral**

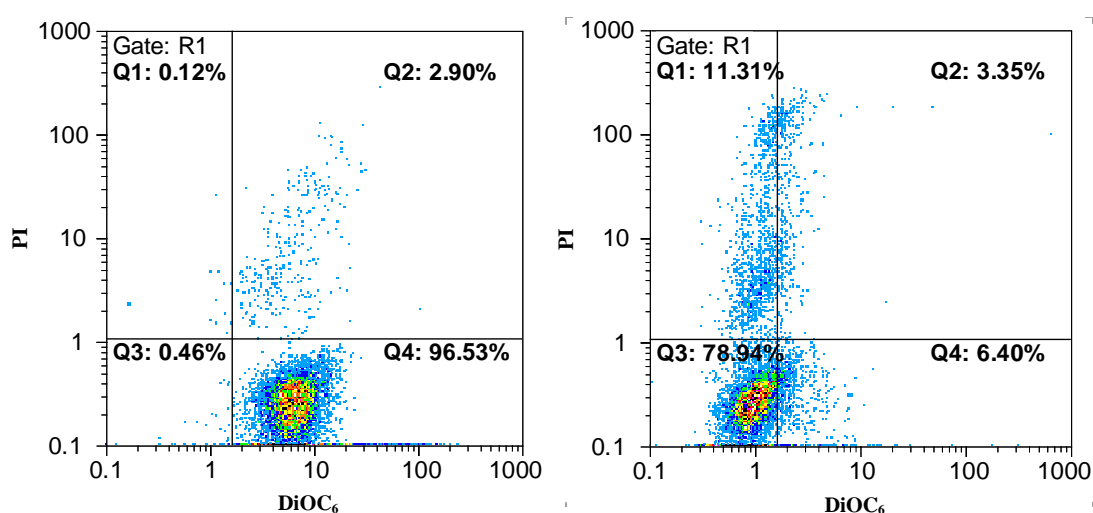
Após a realização dos ensaios de produção de rAdVs em sistema agitado, para as células 1G3 e HEK293, foram registadas diferenças significativas na produtividade das duas linhas celulares. De forma a tentar entender melhor estas diferenças, adicionalmente à análise metabólica e de pH, foram analisados outros factores com possível influência na produção viral.

#### **3.4.1. Análise de morte celular**

Um dos factores que pode influenciar significativamente um sistema de produção de vectores virais é o aumento da morte celular nas culturas (revisto por Al-Rubeai e Singht, 1998). A morte celular numa cultura de células de mamífero pode ocorrer por vários motivos, desde logo, devido à agitação mecânica, a limitações de metabolitos ou de O<sub>2</sub>, à acumulação de metabolitos tóxicos ou ainda pela infecção viral. Nas culturas celulares, a morte celular pode ocorrer por necrose ou por apoptose. Para ambos os casos, o resultado será a diminuição da viabilidade celular e consequente quebra na produtividade viral (revisto por Arden e Betenbaugh, 2004). A infecção das células pelos rAdVs é um dos factores que pode induzir a morte celular, comprometendo a produtividade do sistema (revisto por Al-Rubeai e Singht, 1998). Sendo assim, com o objectivo de avaliar a influência da morte celular nas culturas, foram analisados, ao longo do tempo, os diferentes estados celulares de culturas de células 1G3 e HEK293.

A análise das populações de células viáveis, apoptóticas, necróticas e a ocorrência de lise celular foi efectuada por citometria de fluxo utilizando os marcadores fluorescentes PI e DiOC<sub>6</sub>. O PI é um agente intercalante, que se liga directamente ao DNA. A membrana plasmática celular, quando intacta, é geralmente impermeável a este marcador, logo, a sua marcação permite distinguir uma população de células viáveis de uma população necrótica, onde as membranas já se encontram danificadas (Ormerod et al. 1992). O DiOC<sub>6</sub> acumula-se

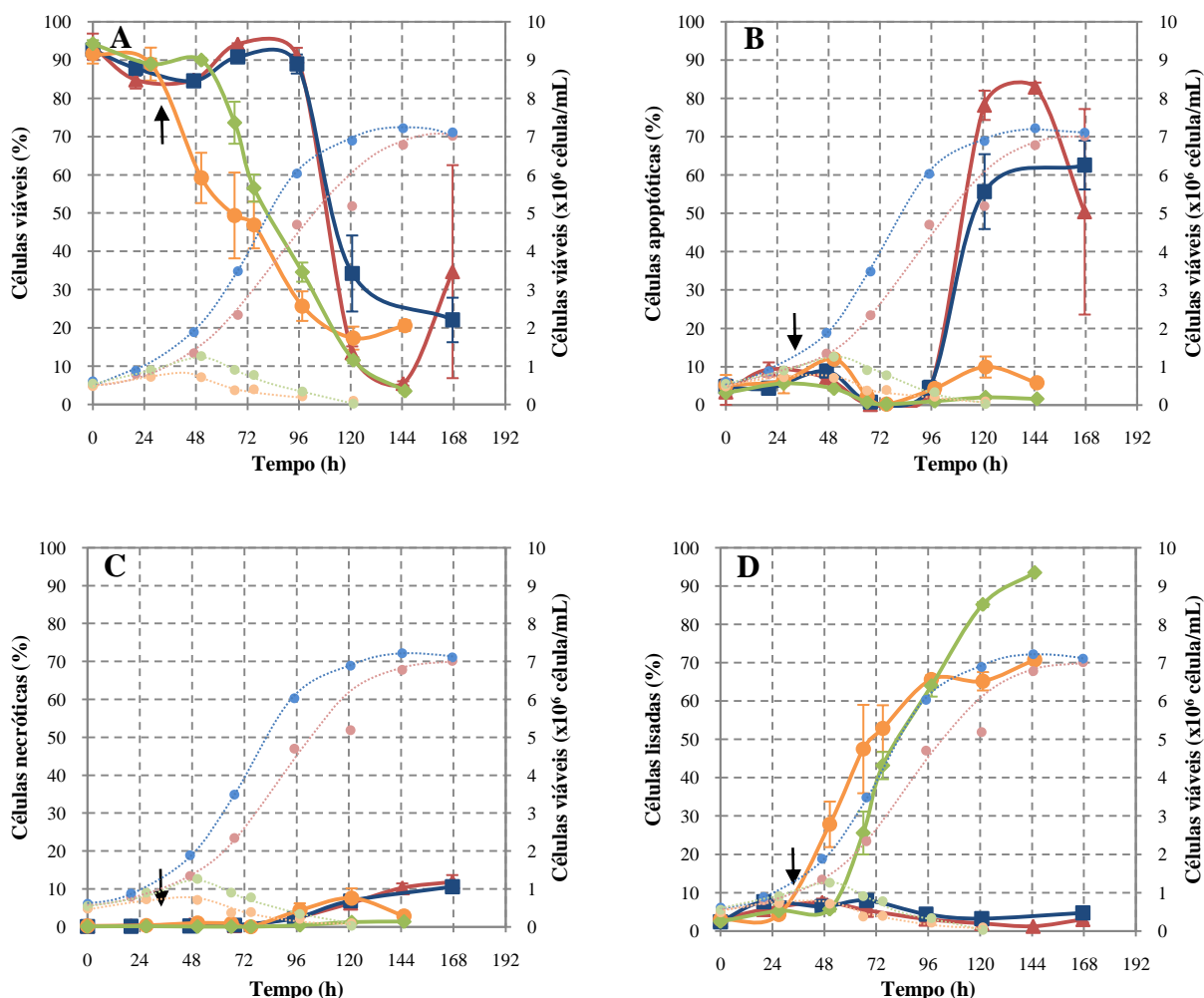
na matriz mitocondrial de acordo com o potencial de membrana deste organelo ( $\Delta\Psi_m$ ). Durante a activação das vias apoptóticas ou necróticas o potencial de membrana mitocondrial desce significativamente, provocando uma diminuição na entrada de DiOC<sub>6</sub> para a matriz (Petit et al. 1995). Assim sendo, através da acção conjunta da marcação do PI e do DiOC<sub>6</sub> foi possível separar as populações nos diferentes estados celulares (figura 19): (i) células viáveis, com membrana plasmática intacta e  $\Delta\Psi_m$  elevado, surgem marcadas negativamente com PI e positivamente com DiOC<sub>6</sub>; (ii) células apoptóticas, com membrana plasmática intacta e  $\Delta\Psi_m$  baixo, surgem marcadas negativamente com PI e DiOC<sub>6</sub>; (iii) células necróticas, com membrana plasmática danificada e  $\Delta\Psi_m$  baixo, surgem marcadas positivamente com PI e negativamente com DiOC<sub>6</sub>; (iv) as células lisadas, com membrana plasmática danificada e  $\Delta\Psi_m$  elevado, surgem marcadas positivamente com PI e DiOC<sub>6</sub>.



**Figura 19.** Exemplos ilustrativos dos diferentes estados celulares de duas culturas.

Q1 – Necrose; Q2 – Lise; Q3 – Apoptose; Q4 – Células viáveis

Desta forma, utilizando este método de marcação por PI e DiOC<sub>6</sub>, foi possível acompanhar ao longo do tempo a evolução das culturas de células 1G3 e HEK293, relativamente aos diferentes estados celulares. Os resultados obtidos desta análise, para células não infectadas e infectadas, encontram-se representados na figura 20.



**Figura 20.** Proporção das populações de células viáveis (A), apoptóticas (B), necróticas (C) e lisadas (D), ao longo do tempo.

1G3: não infectadas (■), infectadas (◆); HEK293: não infectadas (●) e infectadas (●); Crescimento celular: 1G3 não infectadas (●), HEK293 não infectadas (●) e infectadas (●). O momento das infecções encontra-se representado pelas setas (↓). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

Nas culturas de células não infectadas, não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhas celulares, sendo que durante a fase de crescimento celular a proporção de células viáveis manteve-se em valores próximos dos 90%. Durante este período as proporções de células apoptóticas, necróticas e lisadas mantiveram-se bastante baixas (abaixo de 10%). Próximo das 96 horas, ainda antes do final da fase de crescimento celular, observou-se, para ambas as linhas celulares, um rápido aumento na proporção de células apoptóticas, e consequente decréscimo na percentagem de células viáveis. As populações de células necróticas e lisadas mantiveram-se sempre mínimas, ao longo do tempo. Nestes ensaios as células HEK293 apresentaram um crescimento celular mais próximo do observado para as 1G3, atingindo densidades celulares mais elevadas relativamente ao observado anteriormente. Esta observação pode ser justificada, tal como referido em 3.2.1, pelo maior número de

passagens para estas células nestes ensaios, encontrando-se melhor adaptadas ao crescimento em meio Ex-Cell.

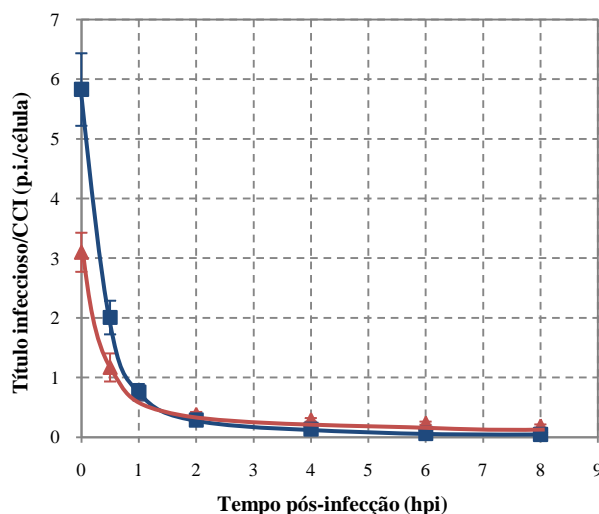
Logo após o momento da infecção, observou-se um rápido decréscimo na proporção de células viáveis, acompanhado pelo aumento da percentagem de lise celular. Para as células 1G3 observou-se o aumento na proporção de células lisadas apenas a partir das 48 hpi, enquanto que para as células HEK293 o aumento na lise celular apenas foi observado a partir das 24 hpi. Sendo o ciclo infeccioso dos adenovírus um ciclo lítico (revisto por Stone *et al.*, 2000), o aumento observado na proporção de células lisadas era de todo espectável. As proporções de células apoptóticas e necróticas mantiveram-se mínimas, mesmo após a infecção, tanto nas células 1G3 como nas HEK293.

Os resultados obtidos permitiram observar que a influência da morte celular (por apoptose ou necrose), durante o processo de produção de rAdVs, é mínima para as células 1G3 e HEK293. No entanto, os métodos de detecção de apoptose e necrose por citometria de fluxo possuem a desvantagem de nem sempre ser clara a distinção entre marcação positiva e negativa, com os marcadores geralmente utilizados, o que reduz a sua precisão (revisto por Arden e Betenbaugh, 2004). No caso do presente trabalho, a detecção da marcação por DiOC<sub>6</sub> está dependente do valor do potencial  $\Delta\Psi_m$  das células, como tal a sua interpretação nem sempre é evidente, já que a marcação segue um gradiente de  $\Delta\Psi_m$  ao longo do tempo. Assim sendo, para uma detecção mais precisa de apoptose/necrose seria necessário recorrer a métodos como a detecção da activação de proteases indutoras de apoptose (caspase-3, por exemplo), utilizando técnicas de Western blot. No entanto, estes métodos são significativamente mais dispendiosos e trabalhosos (revisto por Arden e Betenbaugh, 2004), não estando previsto a sua execução no tempo disponível para este trabalho.

### 3.4.2. Cinética de infecção viral

Num processo de produção de rAdVs, a infecção viral da cultura é o segundo passo, após a fase de crescimento celular (revisto por Altaras *et al.*, 2005). Como tal, a eficiência deste passo de infecção das células torna-se essencial para o sucesso do processo de produção. A infecção das células pelos rAdVs inicia-se com a adsorção das partículas virais às células, através da sua interacção com os receptores membranares CAR, o que pode demorar entre 6 a 8 horas (revisto por Russell, 2000). No entanto, este receptor não é expresso em todas as células humanas (como por exemplo nos macrófagos alveolares) (Kaner *et al.* 1999), para além disso a sua expressão pode variar com o estado fisiológico das células (Liu *et al.*, 2009). Deste modo, com o objectivo de avaliar a eficiência de internalização das partículas virais,

nas células 1G3 e HEK293, foram analisadas as cinéticas de internalização durante as primeiras 8 horas após a infecção. Os títulos de partículas infecciosas extracelulares foram determinados ao longo do tempo, encontrando-se representados na figura 21.



**Figura 21.** Cinéticas de internalização das partículas infecciosas durante as primeiras 8 horas após a infecção.

1G3 (■) e HEK293 (▲). As linhas no gráfico mostram a tendência dos dados experimentais.

A infecção das células foi realizada com uma MOI de 5, no entanto, observaram-se pequenos desvios a este valor, com valores iniciais de partículas infecciosas por célula de  $3,1 \pm 0,3$  e  $5,8 \pm 0,6$ , respectivamente para as células 1G3 e HEK293. Ainda assim, apesar das diferenças iniciais registadas, observou-se que a internalização das partículas virais pelas células se deu rapidamente, para as duas linhas celulares. Ao final de apenas 2 hpi, os títulos virais determinados já são muito baixos ( $0,3 \pm 0,1$  e  $0,4 \pm 0,1$  p.i./célula, respectivamente para as células 1G3 e HEK293). Desta forma, e sabendo que os rAdVs mantêm-se estáveis a 37°C durante o período de 8 horas analisado (Silva, 2003), os resultados obtidos indicam que a grande maioria das partículas virais completaram o seu processo de adsorção e internalização nas células, ao final de 8 hpi.

A realização destes ensaios permitiu observar que o processo de internalização das partículas virais foi semelhante para as células 1G3 e HEK293, permitindo descartar a influência deste factor para as diferenças de produtividades virais observadas nas duas linhas celulares. Contudo, de modo a complementar estas observações pretende-se futuramente analisar a expressão do receptor CAR ao longo do tempo, nas duas linhas celulares. Esta análise poderá inclusivamente permitir adequar o momento da infecção ao momento onde a expressão de CAR é máxima, o que pode contribuir para produtividades virais superiores, tal como descrito por Liu *et al.* (2009)

### 3.5. Ensaios de transfecção

Com o objectivo de testar a possibilidade de utilização das células 1G3 para produção de outros vectores virais (derivados de lentivírus, por exemplo) ou até mesmo de proteínas recombinantes, realizaram-se ensaios preliminares de transfecção transiente. Para estes ensaios foram utilizadas como células controlo a linha HEK293T, regularmente utilizada para sistemas de expressão transiente, devido à sua eficiência de transfecção superior comparativamente com a linha celular mãe HEK293 (revisto por Baldi *et al.*, 2007).

Numa primeira fase foram testados dois meios de cultura diferentes, Ex-Cell e Freestyle, já que o meio de cultura é um factor que pode influenciar de forma crítica a eficiência da transfecção, utilizando PEI como agente de transfecção (revisto por Baldi *et al.*, 2007). O meio Freestyle foi especialmente desenvolvido para permitir a transfecção de células em cultura, permitindo assim servir como controlo para analisar possíveis influências do meio Ex-Cell. Foram testadas diferentes formulações de transfecção, combinando ambos os meios de cultura, para as células HEK293T e 1G3 adaptadas a crescimento em sistema estático. A eficiência da transfecção foi avaliada às 24, 48 e 72 horas pós-transfecção, através da análise por citometria de fluxo da expressão da proteína repórter GFP. Os resultados obtidos indicaram que a expressão máxima de GFP foi obtida às 72 horas pós-transfecção, estando representados no quadro 9.

**Quadro 9** – Eficiência de transfecção (% de células viáveis a expressar GFP) nas diferentes formulações de transfecção testadas.

<b>Form. de transfecção</b>	<b>1G3</b>	<b>HEK293T</b>
<b>100% Ex-Cell</b>	2,2	2,3
<b>100% Freestyle</b>	26,7	27,6
<b>Ex-Cell + 1% FBS</b>	3,9	1,6
<b>Freestyle + 1% FBS</b>	42,1	15,6
<b>75% Ex-Cell + 25% Freestyle</b>	5,3	n.d.
<b>50% Ex-Cell + 50% Freestyle</b>	n.d.	n.d.
<b>25% Ex-Cell + 75% Freestyle</b>	1,6	n.d.
<b>12,5% Ex-Cell + 87,5% Freestyle</b>	3,0	n.d.

n.d. – não detectado

Os resultados obtidos demonstraram que a eficiência de transfecção utilizando o meio Ex-Cell foi significativamente menor, comparativamente ao obtido para o meio Freestyle, em

ambas as linhas celulares. Para algumas das formulações testadas com Ex-Cell, foram obtidos valores de eficiência de transfecção no limiar de detecção do método utilizado, sendo por isso considerados como não detectado (n.d.). Estes resultados demonstraram que de facto existe uma interferência significativa do meio Ex-Cell na transfecção celular. A interferência negativa dos meios de cultura na transfecção deve-se, no geral, à presença de polímeros que comprometem a formação e estabilidade dos complexos PEI-DNA (revisto por Baldi *et al.*, 2007).

Nas condições testadas, as células 1G3 apresentaram, para a formulação 100% Freestyle, uma eficiência de transfecção próxima da observada para as células HEK293T (26,7% e 27,6%, respectivamente). Já para a formulação Freestyle + 1%FBS, a eficiência de transfecção diminuiu para as células HEK293T (15,6%) e aumentou para as células 1G3 (42,1%), sendo neste último caso onde se verificaram eficiências de transfecção mais elevadas.

Assim sendo, foram seleccionadas as formulações de transfecção que melhores resultados apresentaram, 100% Freestyle e Freestyle + 1% FBS, para prosseguir os ensaios com as células adaptadas a crescimento em sistema agitado. Os resultados obtidos estão representados no quadro 10.

**Quadro 10** – Eficiência de transfecção (% de células viáveis a expressar GFP) nas diferentes formulações de transfecção testadas.

<b>Form. de transfecção</b>	<b>1G3</b>	<b>HEK293T</b>
<b>100% Freestyle</b>	37,0	5,4
<b>Freestyle + 1% FBS</b>	47,3	24,0

Estes resultados demonstraram que a eficiência de transfecção para as células 1G3 foi significativamente superior ao obtido para as células HEK293T, para ambas as formulações de transfecção testadas. A formulação 100% Freestyle apresentou resultados inferiores comparativamente ao obtido para Freestyle + 1% FBS, especialmente para as células HEK293T onde a eficiência foi bastante baixa para a primeira.

Estes resultados demonstraram que a transfecção das células 1G3 é possível, ainda assim, as condições de transfecção carecem de optimização, de modo a maximizar a sua eficiência. Para tal, condições como a concentração de DNA utilizada ou a razão PEI:DNA, podem ser optimizadas, de forma a garantir eficiências superiores (Ehrhardt et al. 2006; Zaric et al. 2004).



### 3.6. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho permitiu observar o comportamento da nova linha celular 1G3 quanto à sua utilização para produção de vectores adenovirais, permitindo em sistema agitado a obtenção de títulos de partículas infecciosas superiores ao registado para a linha celular HEK293.

As células 1G3 demonstraram, ao contrário das células HEK293, ser possível realizar a infecção para valores de CCI superiores a  $1 \times 10^6$  célula/mL sem se registar uma quebra crítica na produtividade específica das células, obtendo-se produtividades volumétricas superiores. Observou-se ainda que a eficiência de internalização das partículas virais nestas células foi comparável com as células HEK293 e que a sua infecção não induziu a activação das vias apoptóticas ou necróticas, o que poderia limitar a produtividade.

De modo a avaliar a possibilidade de utilização das células 1G3 para sistemas de expressão transiente, foram realizados alguns ensaios preliminares que demonstraram ser possível transfectar com sucesso as células 1G3. No futuro, será necessário proceder à optimização das condições de transfecção, de modo a maximizar a eficiência obtida.

O sistema utilizado neste trabalho, apesar de se tratar de uma escala de produção pequena, permitiu a identificação de alguns parâmetros importantes na produção viral, entre os quais:

- Limitações metabólicas a nível da glutamina;
- Acumulação de metabolitos tóxicos, como lactato e amónia;
- Decréscimo no pH para valores críticos;
- Diminuição das necessidades celulares de  $O_2$ , após a infecção.

A identificação destes parâmetros pode facilitar um futuro processo de aumento de escala, nomeadamente para bioreactor. Desta forma, o trabalho futuro passará pela análise do comportamento das células 1G3 em bioreactor, onde se pretende:

- Optimizar parâmetros como  $pO_2$  e pH e avaliar a sua influência na produtividade específica das células;
- Avaliar as produtividades específicas obtidas para as infecções realizadas a valores de CCI superiores a  $1-2 \times 10^6$  célula/mL, em condições controladas e optimizadas;
- Proceder à validação e caracterização dos vectores produzidos (por exemplo razão partículas totais/infecciosas, entre outros) nesta linha celular, de modo a garantir a sua qualidade e segurança.

A realização deste trabalho permitiu demonstrar a capacidade e flexibilidade das células 1G3, permitindo não só a produção de rAdVs, mas também de outros bio-produtos de

interesse por expressão transiente, apresentando o potencial para funcionar como alternativa às linhas celulares tradicionalmente utilizadas.

#### 4. Bibliografia

Al-Rubeai, M. e Singht, R. P. 1998. Apoptosis in cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 152-156.

Altaras, N. E., Aunins, J. G., Evans, R. K., Kamen, A., Konz, J. O. e Wolf, J. J. 2005. Production and Formulation of Adenovirus Vectors. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 99: 193-260.

Alves, P. M., Carrondo, M. J. T. e Cruz, P. E. 2008. Introduction to animal cell technology. *In Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (L. R. Castilho, Â. M. Moraes, E. F. Augusto e M. Butler eds), 1ª ed., pp 1-13, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Amable, P. e Butler, M. 2008. Cell metabolism and its control in culture. *In Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (L. R. Castilho, Â. M. Moraes, E. F. Augusto e M. Butler eds), 1ª ed., pp 76-110, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Arden, N. e Betenbaugh, M. J. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends in Biotechnology* 22: 174-180.

Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. e Wurm, F. M. 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters* 29: 677-684.

Bernard, A. R. 2006. Production of proteins by transient expression. *In Cell Culture Technology for Pharmaceuticals and Cell-based Therapies* (S. S. Ozturk e W. Hu eds) 1ª ed., pp 605-626, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Bollati-Fogolín, M. e Comini, M. A. 2008. Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. *In Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (L. R. Castilho, Â. M. Moraes, E. F. Augusto e M. Butler eds), 1ª ed., pp 39-73, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Bouard, D., Alazard-Dany, D. e Cosset, F. 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology* 157: 153-165.

Butler, M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 283-291.

Christie, A. e Butler, M. 1994. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *Journal of Biotechnology* 37: 277-290.

Cruz, H. J., Ferreira, A. S., Freitas, C. M., Moreira, J. L. e Carrondo, M. J. T. 1999. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 579-585.

Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L. e Carrondo, M. J. T. 2000. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 43-52.

Culver, K. W. 1994. *Gene Therapy: A handbook for physicians*. Mary Ann Liebert Inc., Nova Iorque.

Delenda, C., Chillon, M., Douar, A. e Merten, O. 2007. Cells for Gene Therapy and Vector Production. *In* *Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols* (R. Pörtner ed), 1ª ed., pp 23-91, Humana Press, Nova Jersey.

Dormond, E., Perrier, M. e Kamen, A. 2009. From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? *Biotechnology Advances* 27: 133-144.

Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V. e Ludwig, S. 2006. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction* 6: 179-184.

Fallaux, F. J., van Der Eb, A. J. e Hoebe, R. C. 1999. Who's afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Therapy* 6: 709-712.

Ferreira, T. B., Ferreira, A. L., Carrondo, M. J. T. e Alves, P. M. 2005a. Effect of re-feed strategies and non-ammonogenic medium on adenovirus production at high cell densities. *Journal of Biotechnology* 119: 272-280.

Ferreira, T. B., Alves, P. M., Gonçalves, D. e Carrondo, M. J. T. 2005b. Effect of MOI and medium composition on adenovirus infection kinetics. *In Animal Cell Technology Meets Genomics* (F. Gòdia e M. Fussenegger eds), 1ª ed., pp 329-332, Springer, Dordrecht.

Ferreira, T. B., Ferreira, A. L., Carrondo, M. J. T. e Alves, P. M. 2005c. Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. *Biotechnology Letters* 27: 1809-1813.

Garnier, A., Côté, J., Nadeau, I., Kamen, A. e Massie, B. 1994. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* 15: 145-155.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. e Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology* 36: 59-72.

Greber, U. F. e Meier, O. 2003. Adenovirus endocytosis. *The Journal of Gene Medicine* 6: 152-163.

Griffiths, B. 1986. Scaling-up of Animal Cell Cultures. *In Animal cell culture* (R. I. Freshney ed), 1ª ed., pp 33-69, IRL Press, Oxford.

Griffiths, B. 2000. Scaling-up of animal cell cultures. *In Animal Cell Culture* (J. R. Masters ed), 3ª ed., pp 19-67, Oxford, Nova Iorque.

Gueret, V., Negrete-Virgen, J. A., Lyddiatt, A. e Al-Rubeai, M. 2002. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. *Cytotechnology* 38: 87-97.

Gódia, F. e Cairó, J. J. 2006. Cell Metabolism. *In* Cell Culture Technology for Pharmaceuticals and Cell-based Therapies (S. S. Ozturk e W. Hu eds), 1ª ed., pp 81-112, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Imler, J. 1995. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 13: 1143-1151.

Jardon, M. e Garnier, A. 2003. PH, pCO<sub>2</sub>, and temperature effect on R-adenovirus production. *Biotechnology Progress* 19: 202-208.

Kamen, A. e Henry, O. 2004. Development and optimization of an adenovirus production process. *The Journal of Gene Medicine* 6: 184-192.

Kaner, R. J., Bergelson, J. M., Worgall, S., Finberg, R. W., Leopold, P. L., Stolze, E., Milano, E., Hidaka, C., Ramalingam, R., Hackett, N. R., Singh, R., Falck-pedersen, E. e Crystal, R. G. 1999. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20: 361-370.

Kussow, C. M., Zhou, W., Gryte, D. M. e Hu, W. 1995. Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 779-783.

Lee, Y. Y., Yap, M. G., Hu, W. e Wong, K. T. 2003. Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology Progress* 19: 501-509.

Liu, X., Wang, Y., Niu, H., Zhang, X. e Tan, W. 2009. The improvement of adenovirus vector production by increased expression of coxsackie adenovirus receptor. *Biotechnology Letters* 31: 939-944.

Ljunggren, J. e Häggström, L. 1994. Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 808-818.

Léo, P., Galesi, A. L., Suazo, C. A. e Moraes, Â. M. 2008. Animal Cells: basic concepts. *In* Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (L. R. Castilho, Â. M. Moraes, E. F. Augusto e M. Butler eds), 1ª ed., pp 13-37, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Mandel, R. J., Burger, C. e Snyder, R. O. 2008. Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production. *Experimental Neurology* 209: 58-71.

Maranga, L. e Goochee, C. F. 2006. Metabolism of PER.C6™ cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and Bioengineering* 94: 139-150.

Merten, O. 2006. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology* 50: 1-7.

Moraes, Â. M., Mendonça, R. Z. e Suazo, C. A. 2008. Culture media for animal cells. *In* Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (L. R. Castilho, Â. M. Moraes, E. F. Augusto e M. Butler eds), 1ª ed., pp 111-127, Taylor & Francis Group, Nova Iorque.

Mountain, A. 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends in Biotechnology* 18: 119-128.

Mudhakir, D. e Harashima, H. 2009. Learning from the Viral Journey: How to Enter Cells and How to Overcome Intracellular Barriers to Reach the Nucleus. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 11: 65-77.

Nadeau, I., Gilbert, P. A., Jacob, D., Perrier, M. e Kamen, A. 2002. Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism During Growth and Infection with Adenovirus. *Biotechnology and Bioengineering* 77: 91-104.

Nadeau, I., Sabatié, J., Koehl, M., Perrier, M. e Kamen, A. 2000. Human 293 cell metabolism in low glutamine-supplied culture: interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering* 2: 277-292.

- Nadeau, I. e Kamen, A. 2003. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances* 20: 475-489.
- Neermann, J. e Wagner, R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of Cellular Physiology* 166: 152-169.
- Nemerow, G. R. 2000. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 274: 1-4.
- Ormerod, M. G., Collins, M. K., Rodriguez-Tarduchy, G. e Robertson, D. 1992. Apoptosis in Interleukin-3 dependent haemopoietic cells: quantification by two flow cytometric methods. *Journal of Immunological Methods* 153: 57-65.
- Ozturk, S. S. e Palsson, B. O. (1991). Effect of Medium Osmolarity on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 989-993.
- Park, M. T., Lee, M. S., Kim, S. H., Jo, E. e Lee, G. M. 2004. Influence of culture passages on growth kinetics and adenovirus vector production for gene therapy in monolayer and suspension cultures of HEK 293 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 553-558.
- Petit, P. X., Lecoecur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. e Gougeon, M. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 130: 157-167.
- Robbins, P. D., Tahara, H. e Ghivizzani, S. C. 1998. Viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology* 16: 35-40.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Merino, M. J., Culver, K. W., Miller, A. D., Blaese, R. M. e Anderson, W. F. 1990. Gene transfer into humans - Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *The New England Journal of Medicine* 323: 570-578.



Ruffieux, P., von Stockar, U. e Marison, I. W. 1998. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO<sub>2</sub>) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *Journal of Biotechnology* 63: 85-95.

Russell, W. C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *The Journal of General Virology* 81: 2573-2604.

Räty, J. K., Pikkarainen, J. T., Wirth, T. e Ylä-Herttuala, S. 2008. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Current Molecular Pharmacology* 1: 13-23.

Schiedner, G., Hertel, S. e Kochanek, S. 2000. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Human Gene Therapy* 11: 2105-2116.

Schneider, K., Schütz, V., John, G. T. e Heinzle, E. 2010. Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33: 541-547.

Schneider, M., Marison, I. W. e von Stockar, U. 1996. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology* 46: 161-185.

Silva, A. C. 2003. Estudo da estabilidade de vectores para vacinação e terapia génica. Relatório de Estágio. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Sousa, M. F. Q. 2009. Optimização da Estratégia de Fed-batch para Produção de Anticorpos Monoclonais em Sistema de Expressão Transiente. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve.

Stone, D., David, A., Bolognani, F., Lowenstein, P. R. e Castro, M. G. 2000. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *The Journal of Endocrinology* 164: 103-118.

Van Suijdam, J. C., Kossen, N. W. e Joha, A. C. 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 1695-1709.

Walther, W. e Stein, U. 2000. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60: 249-271.

Wu, S., Huang, G. Y. e Liu, J. 2002. Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: a comparative study using microcarrier and stationary cell culture. *Biotechnology Progress* 18: 617-622.

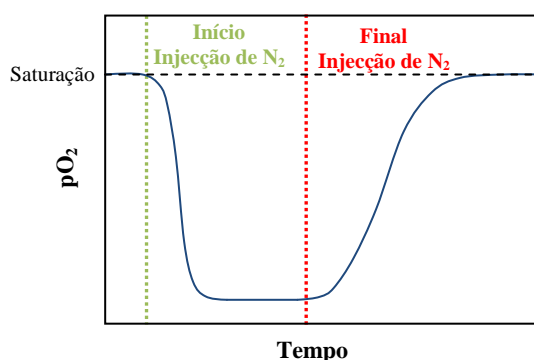
Zaric, V., Weltin, D., Erbacher, P., Remy, J., Behr, J. e Stephan, D. 2004. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *The Journal of Gene Medicine* 6: 176-184.

van der Valk, J., Brunner, D., de Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. e Gstraunthaler, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro* 24: 1053-1063.

## Anexo I

### Determinação do coeficiente de transferência de massa ( $K_La$ )

Para o cálculo do OUR e do  $qO_2$  foi necessário determinar os valores do coeficiente de transferência de massa, ou  $K_La$ . A determinação dos valores de  $K_La$  foi efectuada com base no método de “gassing-out”, descrito por (Van Suijdam et al. 1978). Sucintamente, este método baseia-se na remoção completa de  $O_2$  do meio de cultura, através da injeção de nitrogénio ( $N_2$ ). Quando o valor de  $pO_2$  atingiu aproximadamente 0%, a injeção de  $N_2$  foi desligada, observando-se um incremento nos valores de  $pO_2$  (figura 22).

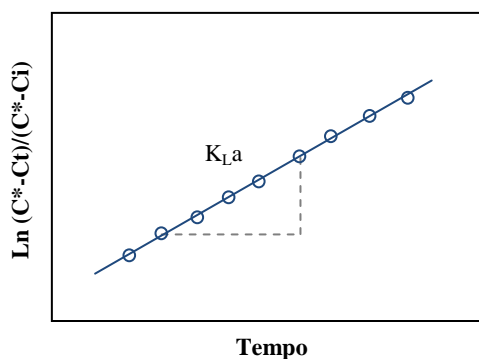


**Figura 22.** Representação esquemática do método de “gassing-out” utilizado para a determinação de  $K_La$ .

O valor de  $K_La$  foi obtido directamente pela determinação da taxa de incremento do valor de  $pO_2$  em função do tempo, utilizando uma cinética em estado não estacionário, descrita pela equação:

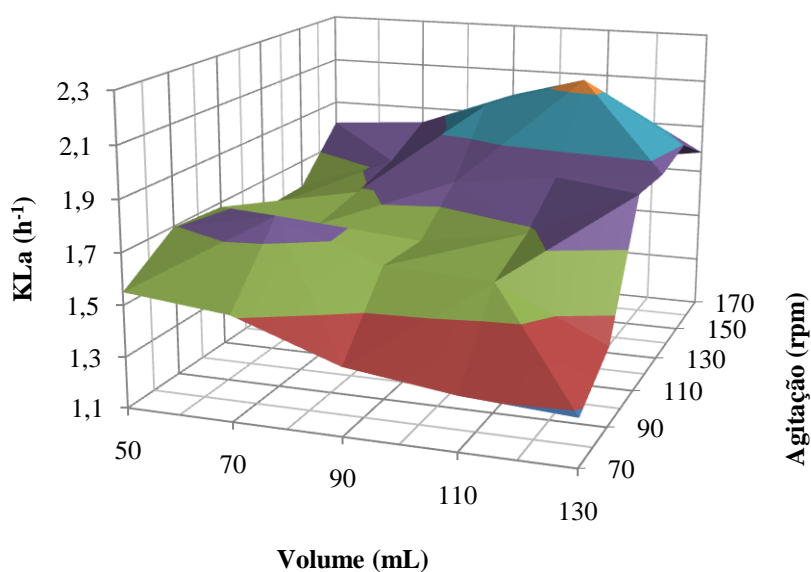
$$\ln \frac{(C_{O_2}^* - C_{O_2,t})}{(C_{O_2}^* - C_{O_2,i})} = K_La \times t$$

onde,  $C_{O_2}^*$  é a concentração de  $O_2$  na saturação,  $C_{O_2,t}$  a concentração de  $O_2$  no instante  $t$  e  $C_{O_2,i}$  a concentração de  $O_2$  no instante inicial  $i$ . O valor de  $K_La$  foi obtido pelo declive da representação de  $\ln \frac{(C_{O_2}^* - C_{O_2,t})}{(C_{O_2}^* - C_{O_2,i})}$  em função do tempo (figura 23).



**Figura 23.** Representação esquemática de  $\ln \frac{(C^*_{O_2} - C_{O_2,t})}{(C^*_{O_2} - C_{O_2,i})}$  em função do tempo para a determinação de  $K_{La}$ .

Este procedimento foi realizado para diferentes combinações de cinco volumes (50, 70, 90, 110 e 130 mL) e seis agitações (70, 90, 110, 130, 150 e 170 rpm), obtendo-se uma vasta gama de valores de  $K_{La}$ . Os resultados encontram-se representados na figura 24, sendo que os dados obtidos permitiram o cálculo dos valores de OUR nas condições de cultura utilizadas.



**Figura 24.** Perfil dos valores de  $K_{La}$  determinados para as diferentes condições de volume e agitação.